

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

YURI MALUF HOKAMA

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae) DO PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE E CONTROLE BIOLÓGICO DE *Phyllosticta citricarpa*.

CURITIBA

2012

YURI MALUF HOKAMA

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae) DO PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE E CONTROLE BIOLÓGICO DE *Phyllosticta citricarpa*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Chirlei Glienke

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Yvelise Maria Possiede

CURITIBA

2012



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **YURI MALUF HOKAMA**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 28 de fevereiro de 2012

Professora Doutora Milena Alves Lima Luna
Dep. Fitopatologia/UFPR – Membro Titular

Professora Doutora Yvelise Maria Possiede
UFMS – Membro Titular

Professora Doutora Josiane Gomes Figueiredo
Dep. Fitopatologia/UFPR – Membro Titular

Professora Doutora Chirlei Glienke
Dep. Genética/UFPR – Orientadora e Presidente da Banca

Visto

Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética



Centro Politécnico - Jardim das Américas - Caixa Postal 19071 - CEP 81531-980 - Curitiba, Brasil
Tel/(+41) 33611587 / 33611684 – Fax (+41) 33611793 – e-mail ppg-gen@ufpr.br

Dedico

A minha amada mãe, Leila...
A minha querida irmã, Lais...
A minha flor, Dayana...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir viver e compartilhar de tão maravilhosas companhias e também por permitir explorar sua grandiosa e majestosa criação!

Agradeço a minha mãe, Leila F. C. Maluf, que provê amor tão incomensurável, que nunca conseguiram por em palavras, e agradeço mais uma vez a Deus, por permitir partilhar de sua caminhada. Agradeço pela confiança, coragem e sabedoria que sempre estarão enaltecidas na minha alma.

Agradeço a minha irmã, Lais Maluf Hokama, que é sempre um grande exemplo de que a força do ser não é medida e nem percebida através de sua forma simples e frágil, mas, sim, pelo que carrega encrustado no espírito.

A minha flor, Dayana Dias Bispo, que me surpreende com um novo sorriso, uma nova palavra e uma nova esperança, a cada novo dia. Hoje, amanhã e sempre.

Meus mais sinceros agradecimentos a minha orientadora, Profa. Dra. Chirlei Glienke, pela oportunidade, ensinamentos e conselhos, pelo amadurecimento científico, e por dar azo a observar a verdadeira natureza de uma líder.

Agradeço a minha querida co-orientadora, Profa. Dra. Yvelise Maria Possiede, que sempre me incentivou a continuar a árdua vida acadêmica, que me apresentou e me ensinou a admirar este verdadeiro universo Fungi. E a quem sempre terei uma dívida de gratidão.

Um agradecimento especial a Profa. Dra Vanessa Kava-Cordeiro e Profa. Dra Ida Chapaval Pimentel que tão gentilmente emprestaram sua sabedoria para construção deste projeto, e não posso deixar de frisar as reconfortantes palavras de incentivo da Profa. Dra Ida.

Agradeço a Profa. Dra Lygia Vitória Galli-Terasawa pela delicadeza e sutileza nas horas mais severas e pelo hilariante e marcante senso de humor.

Agradeço ao laço fraternal que tenho com os inestimáveis Fernando Jung, Douglas Adamoski e Jeferson Vieira que sempre me presentearam com intermináveis discussões a respeito de ciência e boemia. Um agradecimento especialíssimo as lições de Douglas Adamoski, sem ele grande parte disto não seria possível.

Agradeço as amigas Renata Gomes e Daiani Savi por tudo que me ensinaram que foi bastante!

Agradeço a imensa nação labgeniana: Ângela, Andressa, Caroline, Camila, Devânia, Danyelle, Douglas Montenegro, Felipe, Josiane, Josiele, Mariana, Natalia, Pâmela, Rayana, Poliana, Vivian, Eduardo, Lisandra, Elisandro, Vanessa e Paulo.

Aos amigos e ao pessoal de Campo Grande que seguraram a corda em quanto eu estava ausente.

Aos técnicos de laboratório do LabGeM, Ana e Maicon André Wons Fernandes, que sem eles, grande parte disto também não seria possível, em especial a alegre e disposta presença do Maicon durante as jornadas especiais de trabalho.

Ao secretário do programa de pós-graduação em genética, Murilo Odilon Nichele Scroccaro, sempre prestativo.

Ao Departamento de Genética e à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Genética que permitiram a realização deste trabalho.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo suporte financeiro e a Universidade Federal do Paraná por conceder a estrutura, material e pessoal.

A todos o meu muito obrigado!

"Perfection is achieved, not when there is nothing more to add, but when there is nothing left to take away"

Antoine de Saint-Exupéry

"I have not failed. I've just found 10,000 ways that won't work".

Thomas A. Edison

Resumo

Os fungos endofíticos, ou endófitos, pertencem a uma das Classes de fungos que apresentam grande riqueza e ampla distribuição, e, além disso, são capazes de produzir uma enorme variedade de metabólitos que podem ser aplicados nos mais diversos setores da sociedade. O estudo destes microrganismos em áreas remotas ainda é escasso, a exemplo da região do Pantanal sul-mato-grossense, que apresenta características biogeográficas únicas. Uma das particularidades da região são as formações monodominantes de *Vochysia divergens*, popularmente conhecido como Cambará, este vegetal de porte arbóreo também é capaz de produzir substâncias bioativas importantes. O estudo da comunidade de fungos endofíticos em folhas de Cambarás da região pantaneira pode revelar novas espécies de microrganismos com aplicação biotecnológica, como o controle biológico de *Phyllosticta citricarpa*, causador da doença Mancha Preta do Citros (MPC). Este fitopatógeno é o responsável por severas barreiras fitossanitárias impostas pelos países importadores que ainda estão livres da doença, o que resulta em grandes perdas econômicas para o Brasil. O uso de técnicas moleculares na identificação de fungos endofíticos tem-se revelado útil, a exemplo destas ferramentas está o sequenciamento das regiões ITS do rDNA. No presente estudo, 81 isolados tiveram seu DNA extraído e amplificaram a região do gene ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA e de acordo com a análise de máxima verossimilhança os isolados foram agrupados em dois filos, quatro Classes e quinze gêneros do Reino Fungi. De 70 isolados testados contra o fitopatógeno *P. citricarpa*, três apresentaram resultados inibitórios promissores, e após a estratificação dos metabólitos o isolado pertencente a família *Xylariaceae* inibiu cerca de 80% o crescimento micelial e formação de picnídios do fitopatógeno. O gene LSU dos três isolados com maior inibição foi sequenciado para confirmação da identificação via sequencias da região ITS do rDNA.

Palavras-chave: endofíticos, *V. divergens*, *P. citricarpa*, ITS e antagonismo.

Abstract

The endophytes are one class of fungi that possess a great richness and wide geographical distribution and in addition to this are capable to produce a large variety of metabolites that can be applied in several society fields. The surveys of these microorganisms in distant and isolated geographical areas are scarce; one example is the Pantanal of Mato Grosso do Sul, which own unique biogeographical characteristics and one of those peculiarities are the monodominant formations of *Vochysia divergens*, popularly known as "Cambará"; this vegetable is a tree also capable to produce many kinds of bioactive compounds. The study of the fungal endophytes in the "Cambará" leaf from the Pantanal region may lead to the discovery of new microorganism species with biotechnological application, as an example, the biological control of the pathogen *Phyllosticta citricarpa*, the responsible for the disease known as Citrus Black Spot (CBS). This phytopathogen is the cause of many phytosanitary barriers imposed by the foreign buyers free from the disease leading to great economics losses for Brazil. The application of molecular technics in the identification of fungal endophytes has proved useful, for example, the rDNA ITS regions sequencing. In the present work 81 isolates had their DNA extracted and amplified the region gene ITS1 - 5.8 S - ITS2 of the rDNA and according to maximum likelihood analysis isolates were grouped into two phyla, four Classes and fifteen genres of the Fungi Kingdom. 70 isolates were tested against the plant pathogen *P. citricarpa*. Three isolated showed promising results, and after the stratification of the metabolites the isolated belonging to the family *Xylariaceae* inhibited about 80% of mycelial growth and pycnidia formation of the pathogen. The LSU gene of three isolates with the greatest inhibition was sequenced to confirm the results of ITS.

Key words: endophytes, *V. divergens*, *P. citricarpa*, ITS and antagonism.

Sumário

Lista de Figuras	XII
Lista de Tabelas	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. Microrganismos endofíticos	6
3.1.1. Metabólitos secundários	8
3.1.2. Ecologia dos endofíticos	11
3.2. O Pantanal e a planta <i>Vochysia divergens</i> Pohl	13
3.3. Análise taxonômica e filogenética	16
3.3.1. Estudos filogenéticos	19
3.4. <i>Phyllosticta citricarpa</i>	20
4. REFERÊNCIAS	22
5. CAPÍTULO 1	32
1. Introdução	33
2. Métodos	34
2.1. Área de estudo	34
2.2. Isolamento dos endófitos	35
2.3. Caracterização morfológica	36
2.4. Identificação e caracterização molecular dos endófitos	36
2.4.1. Extração de DNA	36
2.4.2. Sequenciamento	37
2.4.3. Edição, Análise das Sequências e Construção das árvores filogenéticas para identificação	38
3. Resultados e discussão	38
4. Conclusão	58
5. Referências	59
6. CAPÍTULO 2	69
1. Introdução	70
2. Métodos	71
2.1. Área de estudo e isolamento	71

2.2.	Testes de Antagonismo <i>in vitro</i> contra o fitopatógeno <i>P. citricarpa</i>	72
2.2.1.	Avaliação de metabólitos não voláteis.....	72
2.2.2.	Avaliação de metabólitos voláteis.....	73
2.2.3.	Obtenção dos extratos	74
2.2.4.	Teste de crescimento micelial	75
2.2.5.	Teste de produção de picnídios.....	76
2.3.	Testes e análises estatísticas	77
3.	Resultados	77
3.1.	Análise dos metabólitos não voláteis.....	77
3.2.	Análise dos metabólitos voláteis.....	81
3.3.	Aplicação dos extratos e avaliação do crescimento micelial.	83
3.4.	Aplicação dos extratos e avaliação da produção de picnídios.	85
4.	Discussão.....	86
5.	Referências	89
7.	DISCUSSÃO GERAL	93
8.	CONCLUSÕES GERAIS	95
9.	APÊNDICES	96
10.	ANEXOS	100

Lista de Figuras

Figura 1 - Localização da Região do Pantanal na América do Sul .	14
CAPÍTULO 1	
Figura 1 – Pontos de Coleta na Fazenda Santa Emília.	35
Figura 2 - Gráfico com a distribuição das espécies.	39
Figura 3 - Árvore filogenética do gene ITS com isolados pertencentes ao filo <i>Basidiomycota</i> obtida através da análise de máxima verossimilhança com 10.000 repetições e enraizada na espécie <i>Geastrum campestre</i> .	43
Figura 4 - Árvore filogenética do gene ITS com isolados pertencentes a Classe Sordariomycetes obtida através da análise de máxima verossimilhança com 10.000 repetições e enraizada com grupo do gênero <i>Glomerella</i> .	47
Figura 5 - Árvore filogenética do gene ITS com isolados do gênero <i>Daldinia</i> obtida através da análise de máxima verossimilhança com 10.000 repetições e enraizada na espécie <i>Neurospora crassa</i> .	48
Figura 6 - Árvore filogenética, realizada através da análise combinada dos genes ITS e 28s, com isolados da família <i>Xylariaceae</i> obtida através da análise de máxima verossimilhança com 10.000 repetições e enraizada na espécie <i>Neurospora terricola</i> .	49
Figura 7 - Árvore filogenética do gene ITS com isolados pertencentes ao gênero <i>Nigrospora</i> obtida através da análise de máxima verossimilhança com 10.000 repetições e enraizada na espécie <i>Neurospora crassa</i> .	50
Figura 8 - Árvore filogenética, realizada através da análise combinada dos genes ITS e 28s, com isolados do gênero <i>Nigrospora</i> obtida através da análise de máxima verossimilhança com 10.000 repetições e enraizada na espécie <i>Neurospora terricola</i> .	51
Figura 9 - Árvore filogenética com isolados pertencentes ao filo Dothideomycetes obtida através da análise de máxima verossimilhança com 10.000 repetições e enraizada na espécie <i>Pyronema domesticum</i> .	54
Figura 10 - Árvore filogenética com isolados pertencentes ao gênero <i>Phyllosticta</i> obtida através da análise de máxima verossimilhança com 10.000 repetições e enraizada na espécie <i>Phyllosticta owaniana</i> .	55
Figura 11 – Estruturas microscópicas dos isolados endofíticos de <i>Vochysia divergens</i> aos 21 dias de crescimento em estufa a 28° C e corados com lactofenol – (a) conídio de <i>Phyllosticta capitalensis</i> (LGMF1139); (b) conídios de <i>Daldinia</i> (LGMF1166); (c) (h) conídios de <i>Xylariaceae</i> (LGMF1134); (d) (g) conídios de <i>Nigrospora</i> (LGMF1131); (e) ascósporo de <i>Mycosphaerella</i> (LGMF1117); (f) (i) conídios de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (LGMF1173) – barra de escala = 10µm	56
CAPÍTULO 2	
Figura 1 – Fluido filtrado das culturas de LGMF1119, LGMF1133 e LGMF1121.	76
Figura 2 – Placas do experimento dos metabólitos não voláteis – Controle Positivo (a), LGMF1133 (b), LGMF1121 (c), LGMF1119 (d), Controle Negativo (e), D60 (f), E43 (g) e E86 (h).	80
Figura 3 - Crescimento micelial do fitopatógeno LGMF06 em três diferentes condições – Controle negativo (a – sem adição), com adição da porção hidrofílica do extrato LGMF1119-hfi (b), Controle positivo (c).	84
Figura 4 – Boxplot dos tratamentos no experimento de formação de picnídios - eb = extrato bruto; hfi = porção hidrofílica; hfo = porção hidrofóbica; mc = macerado de micélio.	85
Figura 5 – fragmento de folhas do experimento de formação de picnídios – tratamento LGMF1119-hfi(a) e LGMF06 controle negativo – sem aditivos (b).	86

Lista de Tabelas

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Posição dos indivíduos de *Vochysia divergens* amostrados e característica do solo..... 35

Tabela 2 – Códigos do depósito na micoteca pública do Laboratório de Genética de Microrganismos – UFPR – e códigos de acesso do GenBank das linhas de referência na análise filogenética..... 39

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Média de crescimento em centímetros com desvio padrão e porcentagem de inibição de *Phyllosticta citricarpa* por isolados endofíticos – Metabólitos não voláteis..... 77

Tabela 2 - Média de crescimento em centímetros com desvio padrão e porcentagem de inibição de *Phyllosticta citricarpa* por isolados, as médias que não compartilham as mesmas letras são significativamente diferentes – Metabólitos voláteis..... 81

Tabela 3 - Média de crescimento em centímetros com desvio padrão e porcentagem de inibição de *P. citricarpa* por extrato – Crescimento micelial com extratos..... 83

1. INTRODUÇÃO

Os últimos 30 anos foram importantes para o avanço do conhecimento geral sobre fungos endofíticos (CARROLL; CARROLL, 1978; PETRINI, 1984; HAWKSWORTH, 1991; STROBEL *et al.*, 2004), no entanto, a despeito das grandes descobertas, ainda há muito mais para ser estudado.

De certa forma o Reino Fungi é subestimado (MINTER, 2010), a ele não é atribuída a sua verdadeira relevância no cotidiano social, como por exemplo, os produtos do metabolismo fúngico são amplamente utilizados em várias indústrias, como do setor de bebidas e alimentos, porém, mesmo estas aplicações sendo usuais e frequentes, muitos organismos deste Reino ainda permanecem desconhecidos (WAINWRIGHT, 1992).

O esforço moderado em compreender os fungos, é maior quando são abordados organismos de comportamento críptico, que não provocam sintomas, que não causam lesões aparentes em seu hospedeiro e até o momento indis põem de métodos eficazes de isolamento, estes são os fungos endofíticos, e por estes motivos é necessário intensificar de estudos sobre eles (HAWKSWORTH *et al.*, 2009).

Atualmente, cogita-se a utilização dos fungos endofíticos até na produção de biocombustível (STROBEL *et al.*, 2008), sendo assim é inegável o potencial da produção de metabólitos destes organismos e seu grau de importância (ANDRE *et al.*, 2010).

O uso indiscriminado de defensivos agrícolas no campo é um problema amplamente conhecido, e hoje, existe um esforço da comunidade científica em busca de soluções sustentáveis (RIBEIRO *et al.*, 2005; JENSEN *et al.*, 2011; BRISBOIS, 2011).

O estudo dos endofíticos abre um novo horizonte sobre esta questão, pois, possibilita a aplicação de produtos naturais contra pragas, que não causam danos aos cultivados e não agredem o ambiente e mesmo assim apresentam eficiência igual ou superior aos defensivos tradicionais (RODRIGUEZ, *et al.*, 2009; SAUNDERS *et al.*, 2010).

A lâmina foliar dos vegetais constitui um dos maiores habitats do planeta, por isso, a distribuição dos fungos endofíticos é global, podendo ser encontrados desde regiões árticas até as mais abundantes florestas tropicais (ARNOLD, 2007).

Em alguns casos os fungos endofíticos desenvolvem uma interação mutualística com a planta hospedeira onde, em troca de nutrientes e proteção contra outros microrganismos ou estresse ambiental, fornecem para a planta metabólitos secundários que são eficientes contra herbivoria, estresse químico e em alguns casos, podem auxiliar a planta a sobrepujar alguma intempérie ambiental tal como seca ou cheia pronunciada (YUAN *et al.*, 2009; WHITE; TORRES, 2010; SAIKKONEN *et al.*, 2010).

Ao esclarecer estas interações, serão desenvolvidas novas ferramentas biotecnológicas para controle biológico de fungos fitopatogênicos (BELESKY; BACON, 2009), como por exemplo, *Phyllosticta citricarpa* e *Colletotrichum gloeosporioides*, cujas doenças causadas por eles, juntas, somam grandes prejuízos à agricultura nacional (POSSIEDE *et al.*, 2009; OGBEBOR *et al.*, 2010).

Diante da complexidade de realizar um isolamento abrangente que represente a riqueza de fungos endofíticos, a escolha de uma região geográfica que seja representativa, ou seja, que em uma pequena área vários tipos biogeográficos

podem ser encontrados torna a tarefa de amostrar a população de endófitos mais simples (O'DWYER; GREEN, 2010).

Uma região do Brasil que possui esta representatividade está localizada no centro do continente sul-americano, onde se encontra uma das maiores planícies alagáveis do planeta, que é conhecida como Pantanal (ARIEIRA *et al.*, 2011).

Este ecossistema é um encontro dos maiores biomas que formam a fauna e a flora brasileira (POTT *et al.*, 2011)

Neste encontro de biomas ocorre o intercâmbio de várias espécies animais e vegetais e espera-se que o mesmo seja verdadeiro para microrganismos (POTT; POTT, 2009; ALHO *et al.*, 2011).

O processo de cheia e seca que ocorre anualmente no Pantanal recebe no meio científico o nome de “pulso de inundação”, e este é fator preponderante em diversos processos ecológicos da região, principalmente na composição da flora local (ARIEIRA; NUNES DA CUNHA, 2006).

As áreas inundáveis do Pantanal abrigam densas populações de Cambarás – *Vochysia divergens* Pohl – os Cambarazais (SOARES; OLIVEIRA, 2009). As folhas e casca deste vegetal são amplamente utilizadas na medicina popular, e pesquisas revelam o seu potencial de produção de substâncias bioativas (FOGO *et al.*, 2009).

As grandes comunidades de Cambará são comumente encontradas em formações monotípicas, localizadas em áreas periodicamente e permanentemente alagadas, sendo que os ciclos de inundações afetam diretamente estas populações (JUNK *et al.*, 1989).

Estes oásis de patrimônio genético, como o Pantanal, devem ser explorados na busca de soluções para os mais diversificados problemas que requerem o uso de

ferramentas biológicas (PAUTASSO, 2009; THOMPSON *et al.*, 2009; DICK; KRESS, 2009).

Por exemplo, o controle biológico de *Phyllosticta citricarpa*, causador da Mancha Preta do Citros (MPC), que é considerada uma praga quarentenária A1 pela União Européia, um dos maiores compradores de citros de origem brasileira (BALDASSARI *et al.*, 2008).

O suco de laranja é a bebida à base de frutas mais consumida no mundo, com 35% de participação entre os sucos. O Brasil detém 50% da produção mundial de suco de laranja, exporta 98% do que produz e participa com 85% no mercado mundial. De cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo, três são produzidos nas fábricas brasileiras. Na safra 2009/2010, a produção brasileira foi de 397 milhões de caixas de laranja de 40,8 Kg. A cadeia produtiva arrecada US\$ 189 milhões em impostos para o Brasil, entretanto os gastos com defensivos agrícolas na cadeia produtiva do citros chegam a US\$ 288,2 milhões. No Brasil, em 2010, foram cerca de 165 milhões de árvores produzindo, enquanto na Flórida, EUA, foram 60 milhões (NEVES *et al.*, 2010).

No ano de 2010, a ocorrência de MPC foi relatada pela primeira vez no território dos EUA, no estado da Flórida. Que anteriormente à detecção da MPC em seus limites, proibia a entrada de citros brasileiro contaminado, isso mostra o avanço da doença (SCHUBERT; SUTTON, 2010).

Acrescenta-se a este cenário o registro de linhagens de *P. citricarpa* com alta resistência aos fungicidas químicos, como por exemplo, o Benomyl®, que atua no sítio de ligação da tubulina, fato que traz à tona a busca por novos compostos químicos eficazes no controle da doença e que sejam preferencialmente de origem natural, ou seja, que não causem danos ao ambiente (POSSIEDE, 2004).

Diante do panorama exposto anteriormente, o presente trabalho é pioneiro no uso de ferramentas moleculares na identificação de fungos endofíticos isolados de plantas pantaneiras, fungos nunca antes estudados, e avalia a utilização dos metabólitos produzidos por estes organismos no controle biológico de *P. citricarpa*, que causa grandes prejuízos para a citricultura brasileira, decorrente de embargos e barreira fitossanitária de seus principais mercados importadores.

2. OBJETIVOS

- Isolamento de fungos endofíticos de plantas de *Vochysia divergens* no Pantanal do rio negro.
- Classificação dos isolados em morfo-espécies de acordo com características macro e micro morfológicas.
- Identificação molecular das morfo-espécies representativas em nível de espécie.
- Bioprospecção dos isolados em relação à sua capacidade de produção de metabólitos secundários para o controle biológico do fungo *Phyllosticta citricarpa*

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Microrganismos endofíticos

Muitas vezes não é fácil estabelecer definições para um grupo de seres vivos sem que sejam artificiais, e desta maneira, não descrevem com exatidão todos que pertencem a tal grupo, ou deixam de fora alguns organismos, ou agrupam organismos que não fazem parte do grupo (TAYLOR *et al.*, 2000; STROBEL; DAISY, 2003).

Por exemplo, a definição para endofíticos de que são todos aqueles organismos que habitam qualquer tecido vegetal, apresenta o problema de incluir as bactérias nodulantes fixadoras de nitrogênio. Nesta Classe de bactérias, o processo de simbiose envolve a formação de estruturas vegetais e bacterianas que criam um ambiente a parte, totalmente adequado para a sobrevivência do simbiote bacteriano e nenhuma outra espécie é capaz de habitar o nódulo (ALBRECHT *et al.*, 1999).

A classificação torna-se mais complicada quando se trata de organismos endofíticos e os patogênicos, pois, são encontradas espécies de fungos que quando albergados nos tecidos de uma espécie de planta são patogênicos, causando lesões graves, e em outras espécies vegetais são endofíticos, ou seja, ausência de qualquer lesão (HERRE *et al.*, 2007).

De maneira natural, a definição de endofíticos vem tornando-se cada vez menos generalista, com o avanço de estudos aplicados a Classes específicas como os patogênicos, os micorrízicos, os nodulantes fixadores de nitrogênio, restando

para os endofíticos a definição de que são todos aqueles que são capazes de habitar o interior de qualquer parte da estrutura vegetal, sem causar dano ou lesões, não produzir nenhum tipo de estrutura externa, interagindo com outras espécies de microrganismos, podendo estes ser cultiváveis em meio de cultura ou não (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

A interação que melhor descreve a relação entre fungos endofíticos e vegetais é a neutra, pois, na maioria dos casos não é percebido nenhuma troca de benefícios entre os organismos, o que revela a necessidade de pesquisas que esclareçam mais estas interações (KOGEL *et al.*, 2006).

Dentre estes organismos estão inclusos fungos, bactérias e actinomicetes, sendo que o primeiro até o momento apresenta maior abundância e riqueza (UNTERSEHER; SCHNITTLER, 2010).

São ainda precárias as informações sobre o relacionamento entre o hospede e o vegetal hospedeiro, sobre as populações das espécies endofíticas, sobre as substâncias produzidas por estes organismos e a própria interação destes com outros microrganismos da população que vivem a sua volta (ARNOLD, 2007).

É importante também o delineamento de experimentos que permitam compreender melhor a sua genética, assim como a prospecção destes para biotecnologia e para sua conservação (HAWKSWORTH; ROSSMAN, 1997).

O interesse em se estudar os fungos endofíticos aumentou com a descoberta da primeira substância anticâncer de origem fúngica isolada do endófito *Pestalotiopsis microspora*, a substância produzida pelo fungo é um taxol denominado paclitaxel, e o fungo foi isolado de uma planta do Himalaia da espécie *Taxus wallichiana* (STROBEL *et al.*, 1992; MAHESHWARI, 2006).

Depois desta descoberta vieram outros estudos sobre as substâncias produzidas por este grupo, e diversos metabólitos foram isolados, inclusive alguns que comprovadamente auxiliam a planta que hospeda o microrganismo endofítico a transpor uma situação de estresse ou até mesmo a ocupar um ambiente inóspito. Como o que ocorre em algumas espécies vegetais de solo vulcânico, que tem sua distribuição nos EUA, fungos endofíticos do gênero *Curvularia* produzem metabólitos secundários termo protetores que ajudam a planta a ocupar o solo que tem temperatura constante de 50°C. Em um estudo comparativo entre plantas capazes ou não de ocupar área quentes, as plantas que tiveram o fungo *Curvularia* sp identificado em seus tecidos foram bem sucedidas na colonização deste tipo de solo, enquanto aqueles que não possuíam o microrganismo endofítico não foram capazes de ocupar as áreas quentes (REDMAN, REGINA S *et al.*, 2002).

3.1.1. Metabólitos secundários

Os metabólitos secundários são moléculas bioativas produzidas por organismos. Estas moléculas não são essenciais para seu crescimento, mas conferem vantagens para o fungo na obtenção de fontes energéticas ou na ocupação de um habitat, assim como podem conferir vantagens a seu hospedeiro (PETRINI *et al.*, 1993).

Várias substâncias de importância farmacêutica estão sendo estudadas e bioprospectadas a partir de endofíticos isolados das mais variadas espécies vegetais em todo o mundo (DESHMUKH *et al.*, 2009; DE FELÍCIO *et al.*, 2010).

Os campos nos quais estas substâncias são utilizadas são: produção de antibióticos, produtos antivirais, os antibióticos voláteis, agentes anticâncer,

antioxidantes, produtos com atividade inseticida, antidiabéticos isolados de plantas em florestas tropicais e imunossupressores (STROBEL; DAISY, 2003).

Estudos mais recentes com relação à produção de metabólitos secundários em microrganismos endofíticos revelam que a substância asparaginase que tem sua origem na atividade da glutaminase em *Colletotrichum* sp é responsável por uma significativa inibição, e em alguns casos inibição total, de células cancerígenas de adenocarcinoma de cólon e de hepatocarcinoma (THEANTANA *et al.*, 2007). Mostrando assim, o grande potencial deste microrganismo em produzir substância de importância farmacológica que pode solucionar problemas médicos complexos.

Os metabólitos dos endofíticos podem ser usados também para diminuir a emissão de poluentes e efluentes tóxicos nas mais diversificadas atividades industriais como, por exemplo, a indústria sucro-alcooleira (STAMFORD *et al.*, 2002; BODDEY *et al.*, 2003), o polpeamento de celulose ou qualquer outro processo industrial que envolva a quebra de moléculas orgânicas complexas em moléculas menores de interesse econômico (OSES *et al.*, 2006).

O estudo destas moléculas esta voltado principalmente para as substâncias lignolíticas, celulolíticas e laccases, isto é, substâncias capazes de degradar os materiais vegetais sem prejuízo da matéria prima de interesse, com as vantagens de serem economicamente viáveis e também diminuir a emissão de poluentes principalmente nos mananciais de água (SCHULZ *et al.*, 2002).

Microrganismos endofíticos da família *Xylariaceae* foram isolados de folhas de plantas tropicais no norte de Tailândia e testados quanto a sua capacidade de produzir substâncias lignolíticas. Em condições ótimas, conseguiu-se produzir uma

quantidade de 195 U/L (mol/min/litro) de substâncias com potencial lignolítico (URAIRUJ *et al.*, 2003).

Em outro estudo foi avaliada a importância dos fungos endofíticos em habitar os tecidos vegetais anteriormente a queda da folha, e observou-se que quando os microrganismos estão ausentes antes da queda foliar, eles não são capazes de participar da decomposição da folha, esclarecendo alguns pontos da relação entre hóspede e hospedeiro e ciclagem de nutrientes no meio. Após a queda da folha e durante a decomposição saprofítica. Foram isolados microrganismos pertencentes às espécies *Coccomyces nipponicum*, *Lophodermium* sp., *Geniculosporium* sp., e *Colletotrichum gloeosporioides* observou-se que *C. nipponicum* e *Lophodermium* sp. são responsáveis também pela produção de substâncias ativas na decomposição da matéria orgânica (KOIDE *et al.*, 2005).

Um campo importante são os pigmentos naturais, considerados mais seguros que os sintéticos, e de vasta aplicação, desde a indústria alimentícia até a indústria de cosméticos (DAVOLI *et al.*, 2005).

O grande problema está no acesso a grandes quantidades de pigmentos naturais, o que remete mais uma vez aos microrganismos, pois, eles possuem crescimento rápido que pode ser utilizado na produção de grandes quantidades de pigmento (JIANG *et al.*, 2005).

Grande parte dos corantes de origem fúngica é extraída de diversas espécies do gênero *Penicillium* sp. como exemplo *Penicillium herquei* (ROBINSON *et al.*, 1992) e *Penicillium persicinum* (WANG, L. *et al.*, 2004).

Recentes estudos com fungos endofíticos produtores de pigmento vermelho levaram a identificação de mais um isolado do gênero *Penicillium* sp. Neste estudo foram utilizadas técnicas de identificação molecular através da região ITS do rDNA (QIU *et al.*, 2009).

3.1.2. Ecologia dos endofíticos

O mais importante na busca da compreensão das relações estabelecidas entre a comunidade de endofíticos com todos os outros fatores bióticos e abióticos que os cercam, é que, de uma forma ou de outra, estes esforços serão direcionados para proveito deste conhecimento pelo ser humano, como por exemplo, o controle biológico de pragas (VEGA, 2008).

A ecologia de fungos endofíticos leva em conta o estudo da diversidade destes em todos os sistemas possíveis, a especificidade das espécies endofíticas com seus hospedeiros, seu relacionamento com outros microrganismos da comunidade e sua distribuição geográfica (SAIKKONEN *et al.*, 2006).

Em sua revisão Arnold (2007) oferece uma grande contribuição a respeito das fronteiras já alcançadas assim como os novos paradigmas a respeito da ecologia dos fungos endófitos, e enumera quatro temas que cobrem a maioria da literatura produzida a respeito dos endófitos: em primeiro lugar é citada a distinção taxonômica e ecológica entre endófitos e patogênicos; em segundo, a discussão em um contexto evolucionário dos estudos que consideram os genótipos a unidade biológica relevante; em terceiro, o enquadramento dos endófitos em um cenário onde o fator mais importante é o vegetal onde o fungo está hospedado e sua localização geográfica, e por fim novamente a discussão do contínuo endofítico – patogênico – saprofítico sobre um aspecto evolutivo e ecológico.

A grande maioria dos experimentos ecológicos envolve a simplificação de um sistema para que possamos de maneira mais clara descrever as interações que imperam neste ambiente (TOWNSEND; HARPER, 2010).

Foi neste sentido que em um estudo que visa os padrões filogenéticos e biogeográficos de fungos endofíticos isolados em briófitas inovou.

Devido à ausência de tecidos vascularizados em briófitas, o estudo das interações entre endófitos e seus hospedeiros se torna mais fácil, vale ressaltar como mérito, o grande esforço empregado neste trabalho, que teve proporções globais, como a distribuição das briófitas é cosmopolita, foram amostradas áreas nos EUA, Alemanha e Nova Zelândia. Neste estudo comprovou-se que as distâncias geográficas explicam melhor as diferenças entre as comunidades de endófitos do que a filogenia do hospedeiro (DAVIS; SHAW, 2008).

Em outro estudo foram avaliadas diferenças na diversidade de fungos endofíticos em uma mesma espécie vegetal, porém em duas situações diferentes, na primeira condição, foram isolados os microrganismos de uma área nativa de *Centaurea stoebe*, e na segunda condição uma área invadida por esta espécie, ao todo foram avaliadas 102 populações de *C. stoebe*. Em um esforço amostral que incluiu áreas nos EUA, Canada e Rússia observou-se que há diferenças nas comunidades de fungos endofíticos entre as áreas nativas e as invadidas, sendo que nas áreas nativas foi possível estabelecer uma espécie dominante de fungo endofítico, o fungo *Alternaria alternata*, já nas áreas invadidas não foi possível estabelecer a espécie dominante de fungo endofítico, não dando suporte as hipóteses levantadas pelo autor de co-introdução de endófitos e vegetais e o salto entre hospedeiros (SHIPUNOV *et al.*, 2008).

A especificidade entre fungo endofítico e planta hospedeira foi estudada por Huang e seus colaboradores (2009), em um levantamento realizado em três espécies do gênero *Artemisia* sp usando abordagens morfológicas e moleculares. *A. capillaris*, *A. indica*, e *A. lactiflora* e seus isolados foram comparados e os resultados apontam que *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, e *Xylaria* são os gêneros fúngicos dominantes neste gênero de plantas e alguns destes endofíticos apresentam especificidade de tecido e hospedeiro.

3.2. O Pantanal e a planta *Vochysia divergens* Pohl

O Pantanal é o ponto de confluência de vários biomas, onde são encontradas as formações típicas de cerrado, floresta amazônica, chaco e bosque chiquitano e até mesmo alguns focos de mata atlântica e caatinga (POTT; POTT, 2009) (Figura 1).

Embora exista a crença popular que a região do Pantanal possui alta taxa de endemismo, o mesmo se revela completamente o contrário, pois, como dito anteriormente ocorre um grande fluxo de espécies entre biomas (SANTOS, 2009).

O Pantanal está localizado na região Centro-Oeste do Brasil, inserido na bacia hidrográfica do Alto rio Paraguai, com uma área de 361.666 Km² e planície inundável de aproximadamente 138.183 Km². A área do Pantanal é dividida em 11 sub-regiões, que leva em consideração os rios que drenam cada local, os níveis de inundação e denominações regionais (SILVA; ABDON, 1998).

De acordo com a classificação climática de Köppen, o Pantanal possui clima tropical sub-úmido (Aw). A estação chuvosa é compreendida entre os meses de outubro a março e a seca de abril a setembro (KOTTEK *et al.*, 2006). A média pluviométrica está em torno de 1.100 mm anuais e todos os fatores climáticos do

Pantanal estão fortemente relacionados com o clima da bacia do Alto Paraguai (GARCIA, 1984).

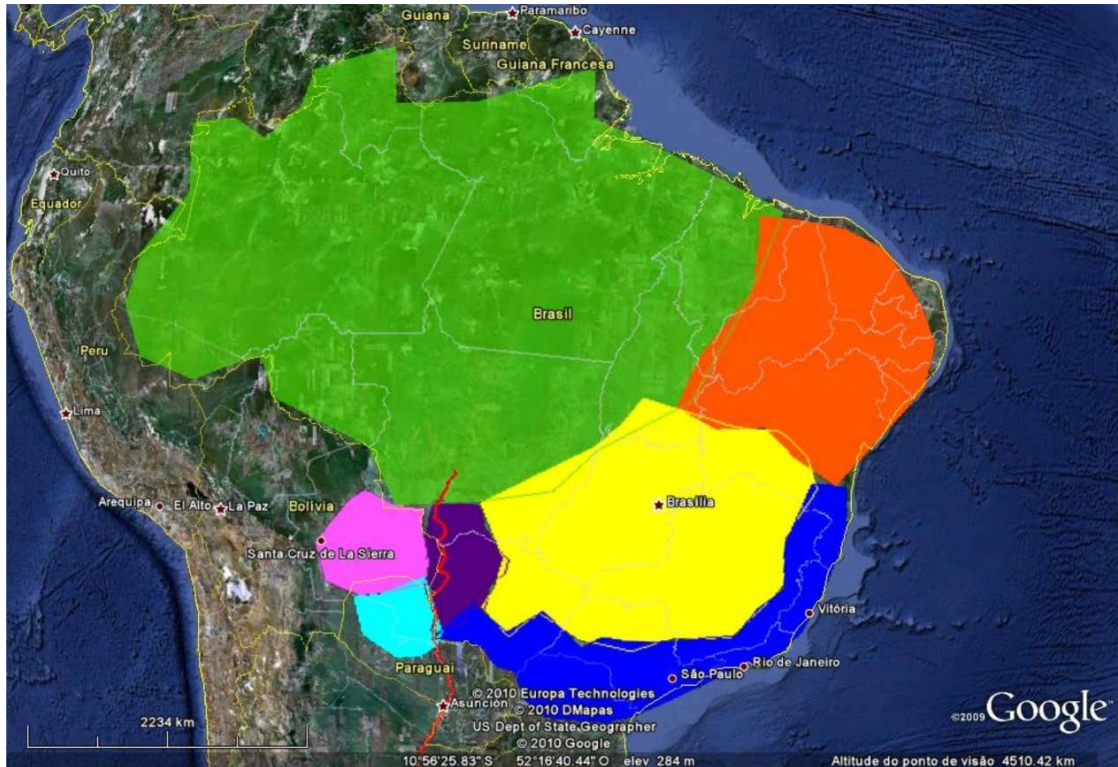


Figura 1 - Localização da Região do Pantanal na América do Sul ¹.

Devido ao caráter dinâmico da planície pantaneira, poucas espécies vegetais com porte arbóreo são capazes de tolerar os longos períodos de cheia que se iniciam em novembro e nas regiões limítrofes da planície chegam até meados de junho.

Entre as espécies vegetais que possuem tolerância a altas taxas luminosas e resistem ao alagamento, está o Cambará - *Vochysia divergens*, que, como vários outros organismos que habitam a região, são sujeitos aos ciclos de cheia e seca e

¹ Nota: O Pantanal é a região central colorido em roxo cortado pela linha vermelha que representa a posição real do Rio Paraguai desde a sua nascente. As outras cores representam as influencias recebida no Pantanal dos biomas adjacentes, em verde a floresta tropical amazônica, em laranja a caatinga em azul a mata atlântica em rosa o bosque chiquitano, ciano o chaco paraguaio e em amarelo o cerrado – Fonte: Mapa obtido através do software Google Earth versão 5.1.

acompanham o pulso de inundação. Arieira e colaboradores (2006) descrevem uma área monodominante, isto é, apresentam mais de 50% do seu dossel ocupado por *V. divergens* e com sucesso confirmam a hipótese de que a densidade da população de Cambará está altamente relacionada com o pulso de inundação, sendo que a parcela com menor nível da lamina d'água apresentou maior diversidade de outras espécies, ou seja, menor dominância de *V. divergens*.

Mais ao sul do rio Paraguai, entre as cidades de Corumbá e Ladário no estado de Mato Grosso do Sul, outro estudo corrobora os dados do trabalho anterior, 108 parcelas de 10m X 10m ao longo do rio foram analisadas e todos os indivíduos com altura igual ou superior a um metro e quarenta e cinco foram amostrados, a distribuição topográfica das espécies foi levada em consideração assim como correlacionadas com a duração da inundação e o tempo cumulativo de cheias desde 1974 até 1995. No total, 695 árvores foram amostradas e dentre as espécies que apresentaram maior índice de importância, ou seja, foram mais abundantes durante a amostragem está *V. divergens* (DAMASCENO-JUNIOR, 2005).

Em seu artigo, Nunes da Cunha e Junk (2004) levam em consideração os reflexos que as mudanças climáticas têm sobre as populações de Cambará, e concluem que o recente e pronunciado ciclo de cheias que se abateram sobre o Pantanal na última década levou esta espécie a tornar-se invasora de campos de pastagens causando grandes prejuízos para a pecuária, o que traz a tona novamente a capacidade de *V. divergens* resistir a longos períodos de inundação, inclusive potencializando o aumento da densidade de indivíduos.

Anos antes, os mesmo autores já citavam que os Cambarazais são intimamente relacionados com a altura da lamina da água. Neste trabalho concluem que em anos de seca mais intensa, a produção de semente de *V. divergens* cai

significativamente sendo que os frutos e sementes são predados por papagaios e ataque de insetos, influenciando drasticamente a população de *V. divergens* (NUNES DA CUNHA *et al.*, 2000).

V. divergens é uma planta amplamente utilizada na medicina popular em forma de chás e garrafadas como analgésico, contra infecções e asma, e por esses motivos foi alvo de estudos de pesquisadores nacionais e internacionais. De sua casca foram isoladas diversas substâncias que tem origem o metabolismo secundário da planta, sendo as principais: β -sistosterol, ácidos serícico e betulínico, sendo que o ácido serícico é responsável por uma pronunciada atividade antifúngica e antibacteriana (HONDA *et al.*, 1995). Também se encontra o ácido tormêntico associado à atividade analgésica e anti-inflamatória (BORTALANZA *et al.*, 2002) e que, em segunda instância, revela a capacidade da planta em produzir grandes quantidades de substâncias que podem prevenir possíveis microrganismos de habitar o seu interior (HESS; MONACHE, 1999).

3.3. Análise taxonômica e filogenética

Um dos temas de grande debate no meio científico recai sobre o uso de técnicas moleculares utilizadas na compreensão da árvore da vida, as relações que existem entre todos os organismos e os caminhos da evolução (MORITZ; CICERO, 2004; MEYER; PAULAY, 2005; PACKER *et al.*, 2009; DEWALT, 2011).

A ferramenta que nos últimos anos é extensivamente utilizada em microrganismos são as regiões de DNA ribossômico (rDNA) que se localizam nas regiões organizadoras de nucléolos, conhecidas como NORs. Estas regiões caracterizam-se por evoluírem rapidamente, o que as levam a uma posição de

destaque entre os vieses moleculares utilizados na construção de árvores filogenéticas e um método facilitador no esclarecimento das relações taxonômicas (NILSSON *et al.*, 2008; SEIFERT, 2009).

As filogenias são estudadas utilizando os caracteres que são compartilhados pelas espécies, não importando se estes caracteres se encontram em um nível macroscópico ou molecular, por isso, em teoria, os dois tipos de caracteres se baseiam nas mesmas regras lógicas, porém, podem-se listar quatro propriedades que tornam a análise de sequências de DNA importante: primeiro, não é possível realizar mais descobertas revolucionárias sobre o estado caráter, pois a molécula de DNA já é bem conhecida e descrita; segundo a quantidade de evidências obtidas através da análise de sequências é gigantesca, quando se leva em consideração a quantidade de pares de base; terceiro, é muito simples reconhecer um caractere independente e por último é possível comparar estas evidências (RIDLEY *et al.*, 2006).

Em uma ampla discussão, existem várias formas de se avaliar uma comunidade e tentar descrever as relações taxonômicas estabelecidas nela e as filogenias dos organismos. Uma destas maneiras são as formas tradicionais de estudos ecológicos utilizando a determinação de índices, como o índice de Shannon para diversidade. Outra maneira são as técnicas de marcadores moleculares e técnicas de sequenciamento. Arnold e colaboradores (2007), compararam a aplicação destas técnicas no levantamento de fungos endofíticos em *Pinus taeda*.

O trabalho conclui que o sequenciamento de regiões do rDNA é um bom instrumento na descrição taxonômica de isolados e fornece estimativas confiáveis a respeito da riqueza de espécies.

Estes dados combinados com outras técnicas filogenéticas como os marcadores LSU (do inglês “large subunit” subunidade maior) do rDNA, foram capazes de detectar espécies que dificilmente são isoladas através das técnicas usuais de amostragem e crescimento em meio de cultura sólido.

Na análise filogenética dessas espécies de fungos endofíticos do gênero *Pestalotiopsis* isolados a partir de plantas medicinais típicas da Índia, os autores combinaram várias técnicas que incluíam descrições morfológicas, marcadores moleculares para polimorfismo e sequenciamento da região ITS. De seus resultados foi possível afirmar que o sequenciamento das regiões de rDNA ofereceram resultados com melhores resoluções a cerca da população em estudo, e que por meio da utilização da análise morfológica em conjunto com o sequenciamento é possível chegar a afirmações seguras a respeito da identificação das espécies (TEJESVI *et al.*, 2009).

Na caracterização morfológica e molecular de outro gênero conhecido e bastante estudado na micologia, *Colletotrichum*, isolado de diversas espécies vegetais na Tailândia, como banana, soja, manga e outras, foi aplicado o sequenciamento de regiões do rDNA ITS1 e ITS2 e foi comprovada a sua utilidade na determinação taxonômica de espécie (PHOTITA *et al.*, 2005).

Uma revisão sobre o gênero *Colletotrichum*, conduzida por um dos autores do trabalho anterior, revela a desorganização que hoje impera na sistemática das espécies que estão agrupadas neste táxon. E traz consigo resultados alarmantes de outros trabalhos que debatem sobre a confiabilidade das comparações com as sequências obtidas através do GenBank com assustadores 86% de identificações errôneas em 343 sequências (HYDE; CAI; MCKENZIE, *et al.*, 2009).

Leotiomicetes também é um grupo com relações taxonômicas complicadas principalmente divergentes quanto às estruturas reprodutivas que são amplamente variadas e segundo hipótese levantada pelo autor pode ter sido gerada pelo estilo de vida levado pelos endofíticos, gerando grandes pressões evolutivas nestas estruturas. Para ajudar na solução destes problemas três genes foram utilizados com sucesso, SSU rDNA, LSU rDNA e 5.8S rDNA (WANG *et al.*, 2009).

Diversas espécies vegetais estão sendo exploradas quanto a seus simbiontes e *Acer ginnala* Maxim, popularmente conhecida como carvalho amu. Um vegetal de porte arbóreo de distribuição típica do continente asiático teve seus endofíticos avaliados quanto à produção do metabólito secundário ácido gálico, um composto fenólico amplamente utilizado nas indústrias químicas. Para a caracterização dos isolados foram empregadas as técnicas de descrição morfológicas em conjunto com a análise de sequências ITS-rDNA. Foram isolados 145 endofíticos e os dez *taxa* mais frequentes incluem *Phomopsis*, *Neurospora*, *Phoma*, *Epicoccum*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Cladosporium* (QI *et al.*, 2009).

3.3.1. Estudos filogenéticos

Entender os mecanismos geradores de variabilidade é preponderante para compreender os caminhos evolutivos. As ramificações nas árvores filogenéticas são geradas por dois processos que são: a anagênese e cladogênese, que respectivamente consistem em mudanças direcionais dentro de uma linhagem e ramificação da árvore pela especiação (FUTUYMA, 1992).

O princípio da máxima verossimilhança envolve cálculos diversificados e métodos estatísticos que de maneira simplificada se resumem em calcular a probabilidade de observar o conjunto de dados obtidos sobre determinado modelo

de substituição nucleotídica, a vantagem deste método sobre as demais análises filogenéticas está na obtenção de resultados quantitativos que permitem estabelecer comparações principalmente a respeito das taxas de evolução, outra vantagem é a possibilidade de comparações entre árvores o que permite analisar qual árvore é a mais provável (HUELSENBECK; CRANDALL, 1997; RIDLEY *et al.*, 2006).

3.4. *Phyllosticta citricarpa*

O fungo *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Van der Aa foi isolado em meados de 1895 como patógeno de plantas cítricas na Austrália (BENSON, 1895), e em 1948 foi denominado de *Guignardia citricarpa* por Kiely, (1948) em um estudo taxonômico. O patógeno é o agente causador da Mancha Preta do Citros (MPC) e foi disseminado por diversos países do mundo incluindo o Brasil (KOTZÉ, 1981; BAAYEN *et al.*, 2002). Recentemente teve suas relações taxonômicas revista, sendo denominado de *Phyllosticta citricarpa* (GLIENKE *et al.*, 2011). Doença responsável por graves problemas a citricultura brasileira, sendo considerada uma praga quarentenária A1 pela União Europeia, um dos maiores compradores de citros do Brasil (SUTTON, 1966).

Diversos autores isolaram espécies de *Phyllosticta* de plantas aparentemente saudáveis, descrevendo-as como endofíticas (CARROLL; CARROLL, 1978; LEUCHTMANN *et al.*, 1992; GLIENKE, 1995). No entanto existe um grande número de relatos citando este gênero como fitopatogênico de diversas culturas com grande importância econômica como arroz (SUGHA *et al.*, 1986), cana-de-açúcar (PONS, 1990), manga e mamão (MCMILLAN JR., 1986), e principalmente em citros (STRINGARI *et al.*, 2009).

Fialho (2004) avaliou *in vitro*, o potencial de linhagens de *S. cerevisiae* como agentes no controle biológico contra *P. citricarpa*, nos frutos pós-colheita, e obteve uma taxa de inibição de 83%, creditando esta porcentagem de sucesso a produção de metabólitos voláteis. Rodrigues (2006) avaliou o efeito dos principais fungicidas utilizados no campo para o controle da doença. Também avaliou 96 linhagens de fungos, para a seleção de potenciais agentes no controle biológico, demonstrando que algumas espécies de *Trichoderma*, são capazes de atuar *in vitro*, como biocontroladores do fitopatógeno *P. citricarpa*.

4. REFERÊNCIAS

ALBRECHT, C.; GEURTS, R.; BISSELING, T. Legume nodulation and mycorrhizae formation two extremes in host specificity meet. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 2, p. 281-288, 1999.

ALHO, C.; FISCHER, E.; OLIVEIRA-PISSINI, L.; SANTOS, C. Bat-species richness in the Pantanal floodplain and its surrounding uplands. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 1, p. 311–320, 2011. SciELO Brasil. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21537604>>. Acesso em: 13/8/2011.

ANDRE, A.; DIAMANTOPOULOU, P.; PHILIPPOUSSIS, A. et al. Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 2, p. 407-416, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669010000038>>. .

ARIEIRA, J.; KARSSSENBERG, D.; JONG, S. M. DE; et al. Integrating field sampling, geostatistics and remote sensing to map wetland vegetation in the Pantanal, Brazil. **Biogeosciences**, v. 8, n. 3, p. 667-686, 2011. Disponível em: <<http://www.biogeosciences.net/8/667/2011/>>. Acesso em: 13/8/2011.

ARIEIRA, J.; NUNES DA CUNHA, C. Fitossociologia de uma floresta inundável monodominante de *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae), no Pantanal Norte, MT, Brasil. **Acta bot. bras.**, v. 20, n. 3, p. 569-580, 2006.

ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2-3, p. 51-66, 2007.

ARNOLD, A. E.; HENK, D. A.; EELLS, R. L.; LUTZONI, F.; VILGALYS, R. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. **Mycologia**, v. 99, n. 2, p. 185–206, 2007.

BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G. et al. Nonpathogenic Isolates of the Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa*, Identified as a Cosmopolitan Endophyte of Woody Plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, v. 92, n. 5, p. 464-77, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18943020>>. .

BALDASSARI, R. B.; REIS, R. F.; GOES, A. A new method for inoculation of fruit with *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **Eur J Plant Pathol.**, 2008.

BELESKY, D. P.; BACON, C. W. Tall fescue and associated mutualistic toxic fungal endophytes in agroecosystems. **Toxin Reviews**, v. 28, n. 2-3, p. 102-117, 2009. Informa Healthcare. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/15569540903082143>>. .

BENSON, A. H. Black spot of the orange. **Agricultural Gazette of New South Wales**, v. 6, p. 249-51, 1895.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 139-149, 2003. Springer Netherlands. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1023/A:1024152126541>>. .

BORTALANZA, L. B.; FERREIRA, J.; HESS, S. C. et al. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 453, p. 203-208, 2002.

BRISBOIS, B. Pesticides, People and Power in Ecuador's Banana Industry: Participatory Epidemiology and Political Ecology Approaches to Occupational Health and Safety. **Antipode**, v. 43, n. 1, p. 176-179, 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1467-8330.2010.00870.x>>. Acesso em: 13/8/2011.

CARROLL, G. C.; CARROLL, F. E. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, v. 56, p. 3034-3043, 1978.

DAMASCENO-JUNIOR, G. A. Structure, distribution of species and inundation in a riparian forest of Rio Paraguai, Pantanal, Brazil. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 200, n. 2, p. 119-135, 2005.

DAVIS, E. C.; SHAW, A. J. Biogeographic and phylogenetic patterns in diversity of liverwort-associated endophytes. **American Journal of Botany**, v. 95, n. 8, p. 914-924, 2008.

DAVOLI, P.; MUCCI, A.; SCHENETTI, L.; WEBER, R. Laetiporic acids, a family of non-carotenoid polyene pigments from fruit-bodies and liquid cultures of (Polyporales, Fungi). **Phytochemistry**, v. 66, n. 7, p. 817-823, 2005.

DESHMUKH, S.; MISHRA, P.; KULKARNI-ALMEIDA, A. et al. Anti-Inflammatory and Anticancer Activity of Ergoflavin Isolated from an Endophytic Fungus. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 5, p. 784-789, 2009. WILEY-VCH Verlag. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.200800103>>. .

DEWALT, R. E. DNA barcoding: a taxonomic point of view. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 30, n. 1, p. 174-181, 2011. North American Benthological Society. Disponível em: <<http://www.jnabs.org/doi/abs/10.1899/10-021.1>>. .

DICK, C. W.; KRESS, W. J. Dissecting Tropical Plant Diversity with Forest Plots and a Molecular Toolkit. **BioScience**, v. 59, n. 9, p. 745-755, 2009. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/27735984>>. Acesso em: 18/7/2011.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2nd ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2010.

FELÍCIO, R. DE; ALBUQUERQUE, S. DE; YOUNG, M. C. M.; YOKOYA, N. S.; DEBONSI, H. M. Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 5, p. 763-769, 2010.

FIALHO, M. B. Efeito in vitro *Sacharomyces cerevicea* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros. , v. Piracicaba, n. Dissertação de Mestrado – Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo., 2004.

FOGO, A. S.; ANTONIOLI, E.; CALIXTO, J. B.; CAMPOS, A. H. Tormentic acid reduces vascular smooth muscle cell proliferation and survival. **European Journal of Pharmacology**, v. 615, n. 1-3, p. 50-54, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299909004725>>. .

FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. 2nd ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 1992.

GARCIA, E. A. C. O clima no Pantanal Mato-grossense. **EMBRAPA/UEPAE de Corumbá**, v. 14 , p. 42, 1984.

GLIENKE, C. Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* kiely detectada por RAPD. , v. Curitiba, n. Dissertação de Mestrado- Setor de Ciências Biológicas, Universidade federal do Paraná., 1995.

GLIENKE, C.; PEREIRA, O. L.; STRINGARI, D. et al. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 26, n. 1, p. 47-56, 2011. Disponível em: <<http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=0031-5850&volume=26&issue=1&page=47>>. Acesso em: 28/9/2011.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, v. 95, n. 6, p. 641-655, 1991. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756209808101>>. .

HAWKSWORTH, D. L.; RAI, M.; BRIDGE, P. D. Mycology: a Neglected Megascience. **Applied Mycology**. p.318, 2009. CABI.

HAWKSWORTH, D. L.; ROSSMAN, A. Y. Where Are All the Undescribed Fungi? **Phytopathology**, v. 87, n. 9, p. 888-891, 1997. Scientific Societies. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.9.888>>. .

HERRE, E. A.; MEJÍA, L. C.; KYLLO, D. A. et al. Ecological Implications Of Anti-Pathogen Effects Of Tropical Fungal Endophytes And Mycorrhizae. **Ecology**, v. 88, n. 3, p. 550-558, 2007. Disponível em: <<http://www.esajournals.org/doi/abs/10.1890/05-1606>>. .

HESS, S. C.; MONACHE, F. D. Divergioic Acid, a Triterpene from *Vochysia divergens*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 10, n. 2, p. 104-106, 1999.

HONDA, N. K.; CRUZ, A. B.; MESSANA, I. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, p. 97-100, 1995.

HUANG, W. Y.; CAI, Y. Z.; SURVESWARAN, S. et al. Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species. **Fungal Diversity**, v. 36, p. 69-88, 2009.

HUELSENBECK, J. P.; CRANDALL, K. A. Phylogeny Estimation And Hypothesis Esting Using Maximum Likelihood. **Annu. Rev. Ecol. Syst**, v. 28, 1997.

HYDE, K. D.; CAI, L.; MCKENZIE, E. H. C. et al. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 1-17, 2009.

JENSEN, H. K.; KONRADSEN, F.; JØRS, E.; PETERSEN, J. H.; DALSGAARD, A. Pesticide Use and Self-Reported Symptoms of Acute Pesticide Poisoning among Aquatic Farmers in Phnom Penh, Cambodia. **Journal of toxicology**, v. 2011, p. 639814, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3018643&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 13/8/2011.

JIANG, Y.; LI, H. B.; CHEN, F.; HYDE, K. D. Production potential of water-soluble *Monascus* red pigment by a newly isolated *Penicillium* sp. **Journal of Agricultural Technology**, 2005.

JUNK, W. J.; BARLEY, P. B.; SPARKS, R. E. The Flood Pulse Concept in River-Floodplain Systems. **Proceedings of the International Large River Symposium. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.**, v. 106, 1989.

KIELY, T. B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* n.sp., the ascigerous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its relation to black spot of citrus. **Proceedings of the Linnaean Society of New South Wales**, v. 73, p. 249-92, 1948.

KOGEL, K.-H.; FRANKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite - what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 4, p. 358-363, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526606000744>>. .

KOIDE, K.; OSONO, T.; TAKEDA, H. Colonization and lignin decomposition of <i>Camellia japonica</i> leaf litter by endophytic fungi. **Mycoscience**, v. 46, n. 5, p. 280-286, 2005. Springer Japan. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10267-005-0247-7>>. .

KOTTEK, M.; GRIESER, J.; BECK, C.; RUDOLF, B.; RUBEL, F. World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 15, n. 3, p. 259-263, 2006.

KOTZÉ, J. M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, v. 65, n. 12, p. 945-950, 1981. Disponível em: <http://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1981Articles/PlantDisease65n12_945.pdf>. Acesso em: 9/8/2011.

LEUCHTMANN, A.; PETRINI, O.; PETRINNI, L. E.; CARROLL, G. C. Isozyme polymorphism in six endophytic *Phyllosticta* species. **Mycological Research**, v. 96, n. 4, p. 287-294, 1992.

MAHESHWARI, R. What is an endophytic fungus? **Current Science**, v. 90, n. NO. 10, 25 MAY, p. 1309, 2006.

MCMILLAN JR., R. T. *Guignardia citricarpa* a cause of black spot on mango foliage in Florida. **Journal of Phytopathology**, v. 117, n. 260-264, 1986.

MEYER, C. P.; PAULAY, G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. **PLoS biology**, v. 3, n. 12, p. e422, 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1287506&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23/7/2011.

MINTER, D. Fungi: the orphans of Rio. **International Society for Fungal Conservation**, v. 1, n. 2, p. 27-31, 2010.

MORITZ, C.; CICERO, C. DNA barcoding: promise and pitfalls. **PLoS biology**, v. 2, n. 10, p. e354, 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=519004&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14/6/2011.

NEVES, M.; TROMBIN, V.; MILAN, P.; LOPES, F. O retrato da citricultura brasileira. **MARKESTRAT Centro de Pesquisas e Projetos em Marketing e Estratégias**, p. 137, 2010. Ribeirao Preto. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:O+retrato+da+citricultura+brasileira#0>>. Acesso em: 13/8/2011.

NILSSON, R. H.; KRISTIANSSON, E.; RYBERG, M.; HALLENBERG, N.; LARSSON, K.-H. Intraspecific ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification. **Evolutionary Bioinformatics** 2008, v. 4, p. 193-201, 2008.

NUNES DA CUNHA, C.; JUNK, W. J. Year-to-year changes in water level drive the invasion of *Vochysia divergens* in Pantanal grasslands. **Applied Vegetation Science**, v. 7, p. 103-110, 2004.

NUNES DA CUNHA, C.; JUNK, W. J.; FAVALESSA, O.; COSTA, C. P.; ALMEIDA, L. Influences of Dry and Flooding Periods on Phenology and the Dynamic of Seedlings and Saplings of *Vochysia divergens* Pohl, in the Pantanal of Poconé. **German-Brazilian Workshop on Neotropical Ecosystems – Achievements and Prospects of Cooperative Research**, p. 3-8, 2000. Hamburg,.

OGBEBOR, N.; ADEKUNLE, A.; ENOBAKHARE, D. Inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sac. causal organism of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) leaf spot using plant extracts. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 213-218, 2010. Disponível em: <<http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/56139>>. Acesso em: 13/8/2011.

OSSES, R.; VALENZUELA, S.; FREER, J. et al. Evaluation of fungal endophytes for lignocellulolytic enzyme production and wood biodegradation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 57, n. 2, p. 129-135, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VG6-4JCCG05-1/2/9dcb626717855acef8dd52805821f92e>>. .

O'DWYER, J. P.; GREEN, J. L. Field theory for biogeography: a spatially explicit model for predicting patterns of biodiversity. **Ecology letters**, v. 13, n. 1, p. 87-95, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2810436&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30/7/2011.

PACKER, L.; GIBBS, J.; SHEFFIELD, C.; HANNER, R. DNA barcoding and the mediocrity of morphology. **Molecular ecology resources**, v. 9 Suppl s1, p. 42-50, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21564963>>. Acesso em: 11/6/2011.

PAUTASSO, M. Geographical genetics and the conservation of forest trees. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 11, n. 3, p. 157-189, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1433831909000031>>. .

PETRINI, O. Endophytic fungi in British Ericaceae: A preliminary study. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 83, n. 3, p. 510-512, 1984. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007153684800509>>. .

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, v. 1, n. 3, p. 185-196, 1993. John Wiley & Sons, Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/nt.2620010306>>. .

PHOTITA, W.; TAYLOR, P. W. J.; FORD, R.; HYDE, K. D.; LUMYONG, SAISAMORN. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. **Fungal Diversity**, v. 18, p. 117-133, 2005.

PONS, N. Estudio taxonomico de especies de *Phoma* y *Phyllosticta* sobre caña de azucar (*Saccharum* sp). . **Fitopatologia Venezolana**, v. 3, p. 34-43, 1990.

POSSIEDE, Y. M. ESTUDOS MORFOLÓGICOS e GENÉTICOS em *Guignardia* spp e *Phyllosticta* sp. **Tese apresentada ao Curso de Pós- Graduação em nível de Doutorado em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Genética, do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.**, v. CURITIBA, 2004.

POSSIEDE, Y. M.; GABARDO, J.; KAVA-CORDEIRO, V. et al. Fungicide resistance and genetic variability in plant pathogenic strains of *Guignardia citricarpa*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 308–313, 2009. SciELO Brasil. Disponível

em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822009000200018&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 13/8/2011.

POTT, A.; OLIVEIRA, A K. M.; DAMASCENO-JUNIOR, G. A; SILVA, J S V. Plant diversity of the Pantanal wetland. **Brazilian journal of biology = Revista brasileira de biologia**, v. 71, n. 1 Suppl 1, p. 265-73, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21537599>>. .

POTT, A.; POTT, V. J. Fitogeografia do Pantanal. **America**, p. 1-4, 2009. Disponível em: <http://www.seb-ecologia.org.br/2009/resumos_professores/arnildo_pott.pdf>. Acesso em: 13/8/2011.

QI, F. H.; JING, T. Z.; WANG, Z. X.; ZHAN, Y. G. Fungal endophytes from *Acer ginnala* Maxim: isolation, identification and their yield of gallic acid. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 98-104, 2009.

QIU, M.; XIE, R.; SHI, Y. et al. Isolation and identification of endophytic fungus SX01, a red pigment producer from *Ginkgo biloba* L. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 993-998, 2009.

REDMAN, REGINA S; SHEEHAN, K. B.; STOUT, R. G.; RODRIGUEZ, R. J.; HENSON, J. M. Thermotolerance Generated by Plant/Fungal Symbiosis. **Science**, v. 298, n. 22 november, p. 1581, 2002.

RIBEIRO, C. A. O.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic Toxicology**, v. 74, n. 1, p. 53-69, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X05001487>>. .

RIDLEY, M.; FERREIRA, H.; PASSAGLIA, L.; FISCHER, R. **Evolução**. Terceira E ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

ROBINSON, N.; WOOD, K.; HYLANDS, P. J. et al. Blue Pigments of *Penicillium herquei*. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 6, p. 814-817, 1992. American Chemical Society. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/np50084a019>>. .

RODRIGUES, M. B. C. Controle de *Guignardia citricarpa*, agente causal da Mancha Preta dos Citros. , v. Dissertação, p. Piracicaba, 2006.

RODRIGUEZ, R. J.; WHITE, J. F.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **The New phytologist**, v. 182, n. 2, p. 314-30, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19236579>>. Acesso em: 24/7/2011.

SAIKKONEN, K.; LEHTONEN, P.; HELANDER, M.; KORICHEVA, J.; FAETH, S. H. Model systems in ecology: dissecting the endophyte-grass literature. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 9, p. 428-433, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TD1-4KJV3C7-3/2/7aea9524078269e29a05be068cc81c69>>. .

SAIKKONEN, K.; SAARI, S.; HELANDER, M. Defensive mutualism between plants and endophytic fungi? **Fungal Diversity**, v. 41, n. 1, p. 101-113, 2010. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s13225-010-0023-7>>. Acesso em: 19/7/2011.

SANTOS, L. G. R. O. ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO DE UNGULADOS FLORESTAIS EM UMA ÁREA DO PANTANAL. **Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**, 2009.

SAUNDERS, M.; GLENN, A. E.; KOHN, L. M. Exploring the evolutionary ecology of fungal endophytes in agricultural systems: using functional traits to reveal mechanisms in community processes. **Evolutionary Applications**, v. 3, n. 5-6, p. 525-537, 2010. Blackwell Publishing Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1752-4571.2010.00141.x>>. .

SCHUBERT, T.; SUTTON, B. Citrus Black Spot (*Guignardia citricarpa*) discovered in Florida. **pbcgov.org**, , n. Kotzé 1981, p. 2008-2010, 2010. Disponível em: <<http://pbcgov.org/coextension/agriculture/citrusblackspotpestalert.pdf>>. Acesso em: 13/8/2011.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.-K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B7XMR-4RT04VJ-4/2/0bd13492de77fe338c3b3568795d4c0b>>. .

SEIFERT, K. A. Progress towards DNA barcoding of fungi. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 83-89, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21564968>>. Acesso em: 19/7/2011.

SHIPUNOV, A.; NEWCOMBE, G.; RAGHAVENDRA, A. K. H.; ANDERSON, C. L. Hidden diversity of endophytic fungi in an invasive plant. **American Journal of Botany**, v. 95, n. 9, p. 1096-1108, 2008.

SILVA, J. S. V.; ABDON, M. M. Delimitação do Pantanal Brasileiro e suas Sub-regiões. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 33, p. 1703-1711, 1998.

SOARES, J. J.; OLIVEIRA, A. K. M. DE. O paratidal do pantanal de miranda, corumbá-ms, brasil. **R. Árvore**, v. 33, n. 2, p. 339-347, 2009.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAÚJO, J. M. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 2, p. 105-109, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V24-44KVVKC-1/2/9025cff8701bb5d03e355127467b9e34>>. .

STRINGARI, D.; GLIENKE, C.; CHRISTO, D. DE; JR., W. M.; AZEVEDO, J. L. High Molecular Diversity of the Fungus *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae*

and New Primers for the Diagnosis of the Citrus Black Spot. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 52, n. 5, p. 1063-1073, 2009.

STROBEL, G. A.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004. American Chemical Society. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/np030397v>>. .

STROBEL, G. A.; KNIGHTON, B.; KLUCK, K. et al. The production of myco-diesel hydrocarbons and their derivatives by the endophytic fungus *Gliocladium roseum* (NRRL 50072). **Microbiology**, v. 154, n. 11, p. 3319-3328, 2008.

STROBEL, G. A.; YANG, X.; SEARS, J. et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallichiana*. **Microbiology**, v. 142, p. 435-440, 1992.

SUGHA, S. K.; SINGH, B. M.; SHARMA, B. M. Studies on *Phyllosticta glumarum* causing glume blight of rice (*Oryza sativa* L.) Himachal. **Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 1, p. 11-14, 1986.

SUTTON, B. *Guignardia citricarpa*. **CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and bacteria**, v. 33, n. 2, p. 271-280, 1966. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2338.2003.00638.x>>. Acesso em: 5/12/2011.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; KROKEN, S. et al. Phylogenetic Species Recognition and Species Concepts in Fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 31, n. 1, p. 21-32, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WFFV-45FC026-S/2/248af3370e2900bb6e85b544dd2ef8ea>>. .

TEJESVI, M. V.; TAMHANKAR, S. A.; KINI, K. R. .; V.S., R.; PRAKASH, H. S. Phylogenetic analysis of endophytic *Pestalotiopsis* ethnopharmaceutically important medicinal trees species from. **Fungal Diversity**, p. 167-183, 2009.

THEANTANA, T.; HYDE, K. D.; LUMYONG, S. Asparaginase production by endophytic fungi isolated from some Thai medicinal plants. **KMITL Sci. Tech. J.**, v. 7, n. S1, 2007.

THOMPSON, I.; MACKEY, B.; MCNULTY, S.; MOSSELER, A. Forest resilience, biodiversity, and climate change. A synthesis of the biodiversity/resilience/stability relationship in forest ecosystems. Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal. Technical Series. **Anais...** p.67, 2009. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Forest+Resilience,+Biodiversity,+and+Climate+Change#0>>. Acesso em: 13/8/2011.

TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. **Fundamentos em Ecologia** . artmed, 2010.

UNTERSEHER, M.; SCHNITTLER, M. Species richness analysis and ITS rDNA phylogeny revealed the majority of cultivable foliar endophytes from beech (*Fagus sylvatica*). **Fungal Ecology**, 2010.

URAIKUJ, C.; KHANONGNUCH, C.; LUMYONG, SAISAMORN. Ligninolytic enzymes from tropical endophytic Xylariaceae. **Fungal Diversity**, v. 13, p. 209-219, 2003.

VEGA, F. E. Insect pathology and fungal endophytes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 3, p. 277-279, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WJV-4S0PKT5-4/2/e757fb9e34b9ea7ce97ee8fc42f0e26f>>. .

WAINWRIGHT, M. **An introduction to fungal biotechnology**. J. Wiley & Sons, 1992.

WANG, L.; ZHOU, H.-B.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. *Penicillium persicinum*, a new griseofulvin, chrysogine and roquefortine C producing species from Qinghai province, China. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, n. 2, p. 173-179, 2004. Springer Netherlands. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1023/B:ANTO.0000036140.86059.51>>. .

WANG, Z.; JOHNSTON, P. R.; YANG, Z. L.; TOWNSEND, J. P. Evolution of Reproductive Morphology in Leaf Endophytes. **PLoS ONE**, v. 4, n. 1, 2009.

WHITE, J. F.; TORRES, M. S. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? **Physiologia Plantarum**, v. 138, n. 4, p. 440-446, 2010. Blackwell Publishing Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01332.x>>. .

YUAN, Z.-LIN; ZHANG, C.-LONG; LIN, F.-CHENG. Role of Diverse Non-Systemic Fungal Endophytes in Plant Performance and Response to Stress: Progress and Approaches. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 29, n. 1, p. 116-126, 2009. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00344-009-9112-9>>. Acesso em: 31/7/2011.

5. CAPÍTULO 1

Diversidade de Fungos Endofíticos de *Vochysia divergens* Pohl do Pantanal do Mato Grosso do Sul.

Hokama, Y. M., Adamoski D.M., Possiede Y. M., Glienke C.

Resumo

Os fungos endofíticos se firmaram nos últimos anos como uma importante ferramenta biotecnológica, sendo eles capazes de produzir uma infinidade de metabólitos secundários. Contudo para acessar esta importante fonte de moléculas bioativas primeiramente é imprescindível realizar um levantamento da diversidade de fungos endofíticos e catalogar a riqueza de espécies de endófitos existente em diferentes biomas. As regiões tropicais são reconhecidas áreas com alta diversidade de endófitos, porém muitas regiões continuam inexploradas, por exemplo, o Pantanal sul-mato-grossense. O presente estudo é pioneiro ao realizar o primeiro isolamento de fungos endofíticos da região e utilizar sequencias do rDNA para identificar estes isolados. No total 81 isolados foram identificados por meio de sequencias da região ITS1 - 5,8S – ITS2 do rDNA, três isolados através do sequenciamento parcial do gene 28S, e de acordo com a análise máxima verossimilhança os isolados foram agrupados em dois Filos, quatro Classes e quinze gêneros do Reino Fungi. Dentre os gêneros identificados, dois deles, *Antrodia* e *Irpex*, foram descritos como endofíticos de folha pela primeira vez. Outros gêneros conhecidos como patogênicos em diversos vegetais, colonizam assintomaticamente folhas de *V. divergens*.

Palavras chave: endofíticos, cambará, ITS, 28S e sequenciamento

Abstract

The endophytic fungi became in recent years an important biotechnology tool, they are able to produce a great variety of secondary metabolites. However to access this important source of bioactive molecules, first is necessary to conduct a survey of the endophytic fungi diversity and catalog the species richness of endophytes in the world. Tropical regions are recognized hot spots of endophytes diversity, but many areas remain unexplored, for example, the Pantanal of Mato Grosso do Sul. This study innovates as it is the first to realize the isolation of endophytic fungi on the Pantanal and explore the fungi diversity. 81 isolates had their DNA extracted and amplified the region ITS1 - 5,8S – ITS2 of the rDNA gene, three of them sequenced partially the 28S gene and according to the maximum likelihood analysis were grouped into two phyla, four Classes and fifteen genres of the Fungi kingdom. The genres *Antrodia* and *Irpex* were described as endophytic and others described as pathogen in several other plant were isolated without showing lesions on the *V. divergens* fresh leaves.

Key words: endophytes, cambará, ITS, 28s and sequencing

1. Introdução

O Pantanal é uma das sete mais importantes planícies alagáveis do planeta (JUNK *et al.*, 2006), sua diversidade de fauna e flora é única, porém, estudos a respeito de sua microbiota são escassos (MINTER, 2010). Devido a grande variedade de ambientes, hospedeiros e o ciclo hidrológico da região, um ecossistema inédito para a micologia e para os estudos moleculares começa a ser explorado.

Os fungos endofíticos habitam e se reproduzem no interior dos tecidos vegetais de forma assintomática, e podem contribuir significativamente para a diversidade global do Reino Fungi (HAWKSWORTH; ROSSMAN, 1997; ARNOLD, 2007; PORRAS-ALFARO; BAYMAN, 2011).

O estudo de microrganismos em regiões remotas e ainda inexploradas, como o Pantanal, auxilia no dimensionamento da riqueza de espécies de fungos endofíticos, e muito além da descoberta de novas espécies, há também a possibilidade de acessar novos compostos produzidos por estes microrganismos, que podem ser explorados para diversas aplicações na biotecnologia (STROBEL; DAISY, 2003; GUO *et al.*, 2011).

As áreas inundáveis do Pantanal abrigam densas populações de uma espécie vegetal de porte arbóreo popularmente conhecido como Cambará – *Vochysia divergens* Pohl - as grandes comunidades de Cambará podem ser encontradas em áreas periodicamente alagadas e áreas permanentemente alagadas (JUNK *et al.*, 1989; ARIEIRA; NUNES DA CUNHA, 2006).

O Cambará também é uma fonte produtora de diversas substâncias, algumas destas, com potencial antimicrobiano (HONDA *et al.*, 1995) e outras substâncias possuem importância farmacológica (HESS, S. C.; MONACHE, 1999).

A região pantaneira e o seu entorno tem sido alvo de forte pressão antrópica. Estas atividades levam a perda espécies e se deve principalmente ao desmatamento de extensas áreas para o uso da madeira em carvoarias e também a criação de pastos para a criação de gado de corte, existe também a problemática da implantação de indústrias ligadas a atividade sucro-alcooleira no entorno da planície do Pantanal que afetam diretamente os mananciais de água, e outras atividades agrícolas são responsáveis por sérios danos a microbiota, fauna e flora da região.

Devido a grande necessidade de um levantamento de fungos endofíticos, em caráter emergencial, graças a perda de áreas e espécies ligadas a atividade antrópica, e grande área de superfície foliar que o Cambará representa na planície pantaneira, sua característica monodominante e a capacidade deste vegetal produzir metabólitos antimicrobianos, *V. divergens* foi escolhida para o primeiro levantamento de fungos endofíticos do Pantanal e sua caracterização molecular.

2. Métodos

2.1. Área de estudo

A área de coleta foi a Fazenda Santa Emília, situada no Pantanal do Rio Negro. As coletas foram realizadas em nove exemplares, entre 2008 e 2010. Na Figura 1 estão representadas as árvores de Cambará que foram amostradas, cada ponto representa uma árvore, os indivíduos marcados com números correspondem à coleta realizada em 2008, já os indicados por letras correspondem aos coletados em 2010. Os indivíduos de *V. divergens* amostrados tiveram suas posições lidas em GPS - Tabela 1.

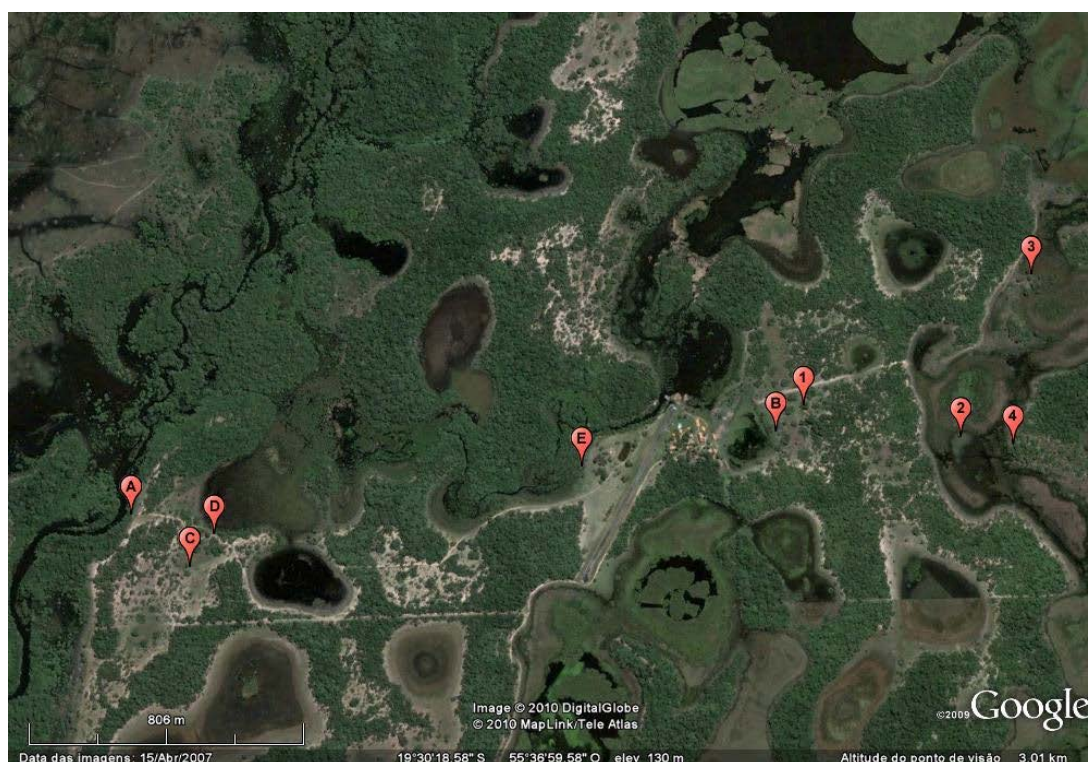


Figura 1 – Pontos de Coleta na Fazenda Santa Emília.

Tabela 1 - Posição dos indivíduos de *Vochysia divergens* amostrados e característica do solo.

Cambará	Localização	Ano de Coleta	Característica do solo
1	19.501944°S/55.601389°W	2008	Seco
2	19.500833°S/55.600556°W	2008	Alagado
3	19.500556°S/55.600278°W	2008	Alagado
4	19.501111°S/55.600556°W	2008	Alagado
A	19.508548°S/55.628775°W	2010	Alagado
B	19.506286°S/55.610172°W	2010	Seco
C	19.509930°S/55.627039°W	2010	Seco
D	19.509038°S/55.626354°W	2010	Alagado
E	19.507243°S/55.615815°W	2010	Seco

2.2. Isolamento dos endófitos

Folhas de *V. divergens* aparentemente saudáveis, sem manchas ou qualquer tipo de lesão causada por insetos, danos mecânicos ou patógenos foram coletados. Todo o

material coletado foi acondicionado em sacos plásticos esterilizados, mantidos e transportados sob refrigeração, por um período que não excedeu 72 horas após a coleta.

Em laboratório, as folhas passaram por um processo de desinfecção, a fim de eliminar microrganismos epifíticos ou qualquer outro da comunidade externa e que consistiu da lavagem das folhas em cinco etapas; 1 – imersão em água destilada esterilizada por 1 minuto; 2 – etanol 70% durante 1 minuto; 3 – hipoclorito de sódio 3% por 4 minutos; 4 – etanol 70% durante 30 segundos; e finalmente, 5 – água destilada esterilizada por 6 minutos. Alíquotas da última água de lavagem foram semeadas em meio de cultura BDA (Batata-dextrose-ágar) como controle negativo, a fim de comprovar a ausência de qualquer organismo epifítico (PETRINI *et al.*, 1993).

Após a desinfecção as folhas foram assepticamente cortadas em fragmentos de 0,5 cm e semeadas em placas de Petri em meio BDA, pH 6,8, acrescido do antibiótico tetraciclina com uma concentração final de $100,0 \mu\text{g/mL}^{-1}$ de meio de cultura para inibir o crescimento bacteriano (PETRINI *et al.*, 1993).

2.3. Caracterização morfológica

A caracterização morfológica consistiu da observação das estruturas macroscópicas do micélio do fungo, como sua coloração e também a observação de estruturas microscópicas como estruturas de reprodução e esporos que serviram de auxílio na classificação taxonômica. As espécies que apresentaram características em comum foram agrupadas (STOYKE *et al.*, 1992).

2.4. Identificação e caracterização molecular dos endófitos

2.4.1. Extração de DNA

A superfície da placa de Petri com meio BDA foi coberta, inclusive nas bordas, com discos de papel celofane (Ø11 cm) esterilizados, os isolados foram incubados durante três dias; O micélio dos fungos foi raspado de forma a não romper o papel celofane e somente o micélio na faixa de crescimento foi utilizado como material para obtenção de DNA com menor quantidade de proteínas e também livre de meio de cultura; Em seguida o material coletado foi depositado em tubos de extração. A extração de DNA foi realizada por meio do kit comercial da empresa MoBio Laboratories Inc[®]. modelo, “UltraClean Microbial DNA Isolation Kit” seguindo o protocolo do fabricante.

2.4.2. Sequenciamento

A reação de amplificação da região ITS foi realizada nas condições descritas por White e Morrow (1990), com os *primers* V9G (HOOG, DE *et al.*, 1998) e ITS4 (WHITE JR.; MORROW, 1990), que são universais para fungos filamentosos e permitem amplificar a região ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA. E a amplificação do gene LSU (Large Subunit) do rDNA foi realizada nas condições descritas por Landvik (1996), com os *primers* LROR e LR5 (VILGALYS; HESTER, 1990), que são universais para fungos filamentosos e permitem amplificar parcialmente o gene LSU. As amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf[®] (Modelo: Mastercycler Gradient).

Para a reação de sequenciamento, o produto de PCR foi diluído em água ultrapura para concentração final de 10 ng/μL. Foi utilizado 1 μL de DNA, 1 μM de *primer* e 2 μL de mistura para sequenciamento ET (kit: “DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE” da Amersham Biosciences[®]), completando com água ultrapura para um volume final de 10 μL. As mesmas condições foram aplicadas para todos os *primers*. A amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf[®] (Modelo: Mastercycler Gradient). Em seguida purificou-se a reação em placas de purificação em gel de

Sephadex™ G-50 medium (GE Healthcare®), em placas de elisa, as amostras foram submetidas à eletroforese em Sequenciador Automático de DNA modelo MegaBACE, da Amersham Biosciences®

2.4.3. Edição, Análise das Sequências e Construção das árvores filogenéticas para identificação.

As sequências DNA dos isolados foram comparadas com as sequências existentes no banco de dados do NCBI – “National Center for Biotechnology Information” - (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) através da ferramenta BLAST (ALTSCHUL, 2005). As sequências com similaridade superior a 98% (ARNOLD; LUTZONI, 2007) foram adicionadas ao bloco de dados.

O alinhamento das sequências de DNA foi realizado com auxílio do programa PRANK (“Probabilistic Alignment Kit”) (LÖYTYNOJA; GOLDMAN, 2005) e posterior inspeção visual através do programa MEGA versão 5.0 (TAMURA *et al.*, 2011).

Os isolados tiveram sua filogenia analisada pelo método de máxima verossimilhança através do *software* GARLI versão 2.0 (ZWICKL, 2006) com 10.000 repetições. As árvores consenso foram construídas com o auxílio do *software* SumTrees incluso no pacote DendroPy versão 3.7.0 (SUKUMARAN; HOLDER, 2010)

3. Resultados e discussão

Ao todo 81 isolados foram utilizados no sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA. Os isolados LGMF1119, LGMF1121 e LGMF1133 tiveram parcialmente sequenciado o gene LSU. Segundo estas análises, estes isolados estão divididos em dois diferentes Filos do Reino Fungi, que são os *Basidiomycota* e *Ascomycota*, Tabela 2.

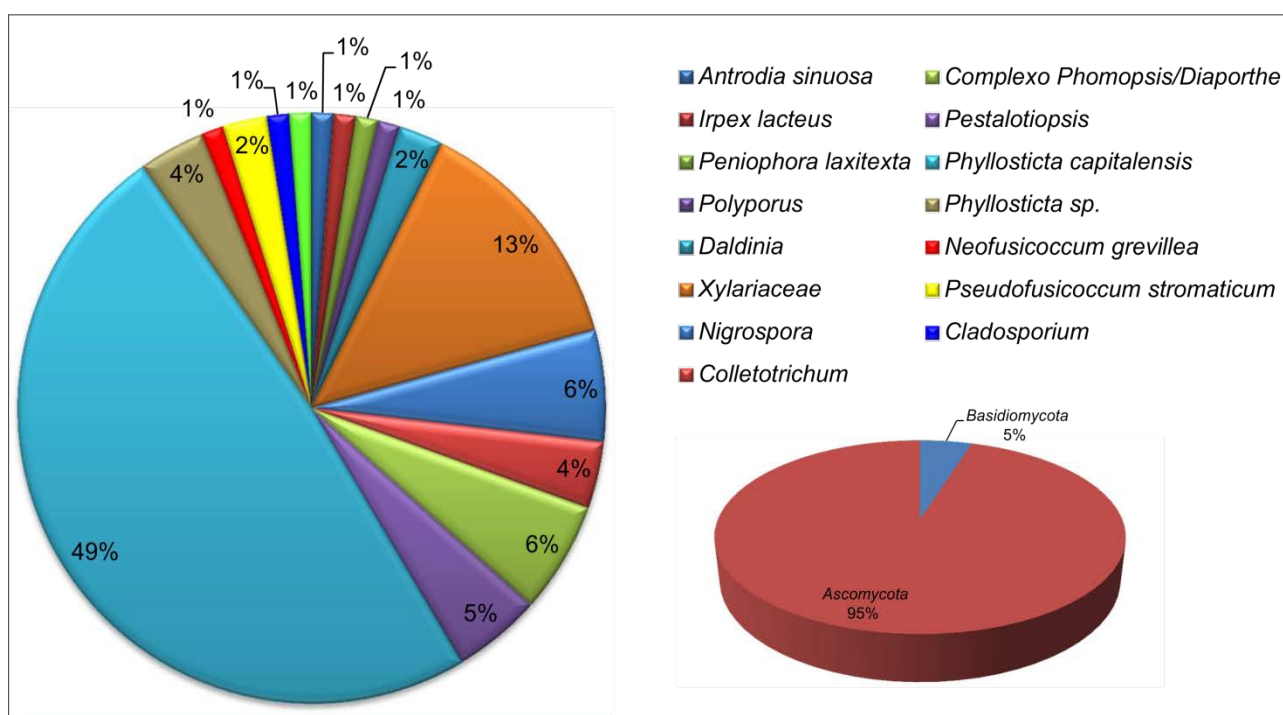


Figura 2 - Gráfico com a distribuição das espécies.

Tabela 2 – Códigos do depósito na micoteca pública do Laboratório de Genética de Microrganismos – UFPR – e códigos de acesso do GenBank das linhas de referência na análise filogenética.

Filo	Classe	Genêro / Espécie / Família	Código Micoteca	Referência para Identificação
<i>Basidiomycota</i>	Agaricomycetes	<i>Antrodia sinuosa</i>	LGMF1145	AJ345011
		<i>Irpex lacteus</i>	LGMF1153	HQ331022
		<i>Peniophora laxitexta</i>	LGMF1159	GU388305
		<i>Polyporus</i>	LGMF1191	JN017923
		<i>Daldinia</i>	LGMF1131	DQ322087
<i>Ascomycota</i>	Sordariomycetes	<i>Xylariaceae</i>	LGMF1166	FJ884195
			LGMF1126	
			LGMF1134	
			LGMF1115	
			LGMF1130	
			LGMF1114	
			LGMF1120	
			LGMF1128	

	LGMF1127	
	LGMF1124	
	LGMF1123	
	LGMF1119	
<i>Nigrospora</i>	LGMF1156	HM565952
	LGMF1121	GU797415
	LGMF1125	HQ832828
	LGMF1133	HQ904082
	LGMF1138	HQ832835
<i>Colletotrichum</i>	LGMF1173	HM038342
	LGMF1137	
	LGMF1135	EU552111
Complexo <i>Phomopsis/Diaporthes</i>	LGMF1144	FJ889447
	LGMF1157	
	LGMF1165	HM347712
	LGMF1141	
	LGMF1136	JN541222
<i>Pestalotiopsis</i>	LGMF1142	
	LGMF1152	
	LGMF1143	JN712498
	LGMF1151	

Tabela 2 - Continuação

Filo	Classe	Genêro / Espécie	Código Micoteca	Referência para Identificação
<i>Ascomycota</i>	Dothideomycetes	<i>Phyllosticta capitalensis</i>	LGMF1139	
			LGMF1177	
			LGMF1161	
			LGMF1174	
			LGMF1140	
			LGMF1181	
			LGMF1194	
			LGMF1115	
			LGMF1195	
			LGMF1183	
			LGMF1148	
			LGMF1179	
			LGMF1126	
			LGMF1150	
			LGMF1186	
			LGMF1182	
			LGMF1178	
			LGMF1175	AB041240
			LGMF1155	
			LGMF1132	AB454332
			LGMF1180	
			LGMF1189	FJ538327
			LGMF1163	
			LGMF1160	
			LGMF1149	
			LGMF1176	
			LGMF1158	
			LGMF1167	
			LGMF1185	
			LGMF1170	
			LGMF1162	
			LGMF1192	
			LGMF1184	
			LGMF1147	
			LGMF1190	
			LGMF1171	
			LGMF1169	
			LGMF1146	
			LGMF1168	
			LGMF1154	
		<i>Phyllosticta</i>	LGMF1193	GU001816
			LGMF1195	
			LGMF1172	FJ538317
		<i>Neofusicoccum grevillea</i>	LGMF1116	JF951137
		<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	LGMF1122	DQ438935
			LGMF1118	
		<i>Cladosporium</i>	LGMF1129	HM148219
		<i>Mycosphaerella</i>	LGMF1117	HQ599603

O Filo *Ascomycota* representa 95% dos isolados e compreende os gêneros *Phyllosticta* e a Família *Xylariaceae* que correspondem respectivamente a 53% e 15% dos isolados, o Filo *Basidiomycota* representa somente 5% dos isolados, Figura 2.

No Filo *Basidiomycota* os isolados do presente trabalho encontram-se agrupados em uma única Classe, Agaricomycetes, que inclui quatro gêneros *Antrodia*, *Irpex*, *Peniophora*, *Polyporus* (Figura 3).

É raro o isolamento de fungos endofíticos pertencentes ao Filo *Basidiomycota*. Estes são frequentemente isolados como fungos micorrízicos na família vegetal *Orchidaceae* ou diretamente no ambiente (RUNGJINDAMAI *et al.*, 2008). Desta forma este estudo é pioneiro no isolamento de *Basidiomycota* endofíticos pertencentes aos gêneros *Antrodia* e *Irpex*, e de forma assintomática a partir de folhas.

O gênero *Antrodia* possui espécies normalmente associadas a podridão marrom, em 30 espécies vegetais lenhosas (KIM; PARK *et al.*, 2001) e algumas espécies associadas a podridão branca (KIM *et al.*, 2003) e as relações taxonômicas deste grupo são bem resolvidas por meio de sequências da região ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA (CHIU, 2007).

Irpex faz parte dos fungos da podridão branca, isto é, é capaz de degradar a celulose e lignina durante a ação saprofítica, desta forma é frequentemente isolado em troncos em decomposição, sendo capazes de produzir uma ampla variedade de metabólitos como manganases, laccases e outras peroxidases (SHIN, 2004; SHIN; KIM, 2005; TODA *et al.*, 2005; TAVČAR *et al.*, 2006).

Peniophora foi isolado como endofítico em *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) no nordeste da China e filogeneticamente identificado através do gene ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA (WANG; GUO, 2005). O autor também citou a incapacidade destes isolados de produzirem estruturas reprodutivas para identificação morfológica o que

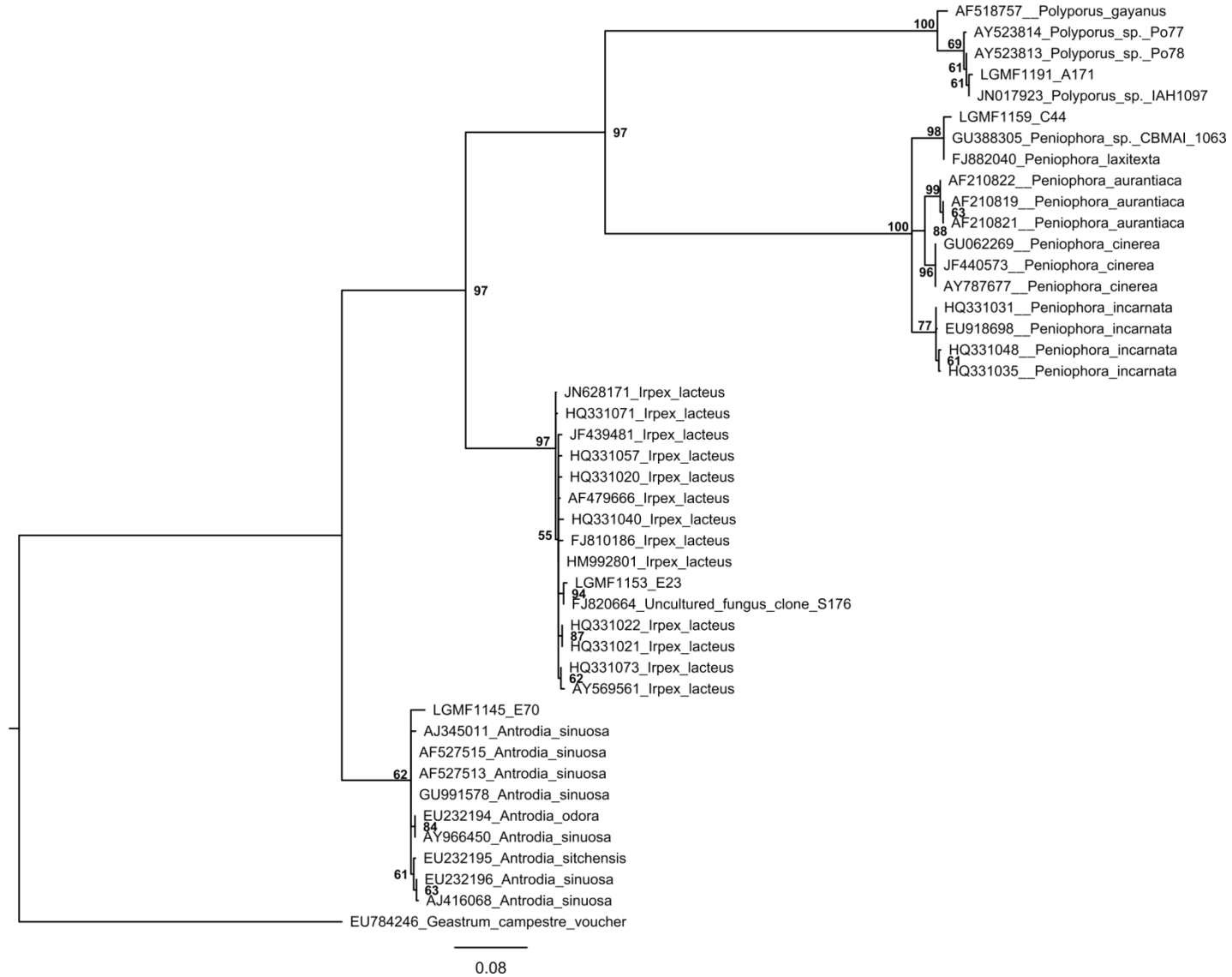


Figura 3 - Árvore filogenética do gene ITS com isolados pertencentes ao filo *Basidiomycota* obtida através da análise de máxima verossimilhança com 10.000 repetições e enraizada na espécie *Geastrum campestre*.

justifica a dificuldade de induzir a produção destas estruturas no presente estudo. *Polyporus* foi isolado como endófito em *Taxus globosa*, mas apenas nos ramos e casca de *T. globosa*, diferentemente do isolado aqui apresentado, que foi isolado de folhas frescas (RIVERA-ORDUÑA *et al.*, 2011). O gênero é um reconhecido produtor de metabólitos eficazes no tratamento de efluentes da indústria têxtil (DAYARAM; DASGUPTA, 2008; SINEGANI *et al.*, 2011).

Os fungos endofíticos pertencentes ao Filo *Ascomycota* isolados neste estudo abrigam duas Classes, Sordariomicetes e Dothideomicetes e segundo Arnold (2007) este Filo e suas Classes correspondem a maioria dos fungos endofíticos isolados em folhas.

Os endófitos pertencentes a Classe Sordariomicetes, são frequentemente encontrados em isolamentos realizados através de cultivo em meio de cultura sólido (ARNOLD *et al.*, 2007) e no presente estudo foram isolados seis gêneros e uma família, que são respectivamente, *Daldinia*, *Nigrospora*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Diaporthe*, *Pestalotiopsis* e a família *Xylariaceae* (Figura 4 a Figura 8).

Xylariaceae e o gênero *Daldinia* (Figura 5 e Figura 6), gênero também pertencente a esta família, não são filogeneticamente bem estabelecidos por meio da análise unicamente do gene ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA sendo necessário uma análise multigênica para obter-se melhores resoluções (TANG *et al.*, 2009). Estes isolados são frequentemente encontrados como endófitos em folhas e são capazes também de produzirem metabólitos secundários (MORAKOTKARN *et al.*, 2007; KARNCHANATAT *et al.*, 2007; OKANE *et al.*, 2008; RIVERA-ORDUÑA *et al.*, 2011).

Os isolados LGMF1131 e LGMF1166, segundo a árvore representada na Figura 5, estão proximamente relacionados a espécie *Daldinia eschscholzii* e provavelmente pertencem ao gênero *Daldinia*. Todos os outros isolados estão relacionados ao isolado FJ884195. Segundo Gazis & Chaverri (2010), este isolado pertencente a família *Xylariaceae*. A árvore filogenética representada na Figura 6 consiste da análise

combinada do gene ITS e 28S do isolado LGMF1119 com vários gêneros da família *Xylariaceae*. Nesta análise o isolado LGMF1119 se posicionou entre os gêneros *Daldinia* e *Hypoxylon*. Desta maneira este isolado necessita de estudos mais acurados para que defina se trata-se de uma espécie de *Daldinia* ou *Hypoxylon* conhecida ou se é uma nova espécie.

Embora *Nigrospora* (Figura 7 e Figura 8) seja um gênero amplamente estudado no que diz respeito a produção de metabólitos secundários (FUKUSHIMA *et al.*, 1998; KIM; CHOI; *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2009) e isolado como endófito em diversas espécies vegetais tropicais, especialmente de plantas medicinais (RIBEIRO *et al.*, 2005; SÁNCHEZ MÁRQUEZ *et al.*, 2007; ORACHAIPUNLAP *et al.*, 2009; BANERJEE, 2011; MARTINEZ-LUIS *et al.*, 2011), este não possui estudos relacionados a sua filogenia ou comparações a respeito da eficácia da região ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA e do gene LSU na sua identificação. Contudo, os estudos anteriores utilizam o sequenciamento deste gene para a identificação dos isolados. Suas estruturas microscópicas são facilmente identificadas como evidenciado na Figura 11 - “d” e “g” - e são importantes ferramentas na identificação deste microrganismo.

A análise filogenética combinada dos genes ITS e LSU representada na Figura 8. confirma as identificações realizadas através da análise do gene ITS (Figura 7) coloca os isolados LGMF1121 E LGMF1133 como pertencentes ao gênero *Nigrospora*.

Assim como *Nigrospora*, o gênero *Pestalotiopsis* é isolado como endófito de plantas medicinais (TEJESVI *et al.*, 2007, 2009). Outros vegetais também são estudados, principalmente aqueles em que este gênero é considerado fitopatógeno e nestes casos a afinidade pelo hospedeiro é considerada um fator importante na identificação da espécie. JEEWON; LIEW, (2004) utilizando a região ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA, encontraram uma grande similaridade entre espécies de *Pestalotiopsis* e afirmaram que a afinidade por hospedeiro não é um parâmetro eficiente. WEI *et al.*, (2007) também utilizaram o gene

ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA para determinar as relações filogenéticas deste gênero, como também para definir quais espécies são patogênicas e quais são endofíticas. Porém, HU *et al.* (2007) investigando a espécie *Pinus armandii* concluiu que somente o gene ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA não oferece bom suporte estatístico e resolução filogenética, quando estes dados são confrontados com os dados morfológicos, e que a análise combinada da região ITS com o gene da beta-tubulina oferece uma resolução melhor.

Muitas espécies de *Colletotrichum* são frequentemente encontradas como fitopatógeno e constituem-se um sério problema econômico em várias culturas agrícolas (TALHINHAS *et al.*, 2002; UREÑA-PADILLA *et al.*, 2002; HYDE; CAI; CANNON; *et al.*, 2009). Por outro lado, diversas espécies endofíticas são isoladas em várias espécies vegetais, principalmente de regiões tropicais, e algumas delas com potencial antimicrobiano (FARR *et al.*, 2006; HUANG; CAI *et al.*, 2009; ROJAS *et al.*, 2010; VEGA *et al.*, 2010; REFAEI *et al.*, 2011).

Todos os trabalhos anteriores utilizaram o gene ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA para identificação dos isolados. No entanto a análise filogenética em conjunto com outros genes é importante para melhores resoluções (HYDE; CAI; CANNON *et al.*, 2009; HYDE; CAI; MCKENZIE *et al.*, 2009)

Diaporthe e *Phomopsis* formam um complexo de espécies frequentemente encontrado como patógenos de soja, uva e amêndoas e são responsáveis por sérios prejuízos nestas culturas (MARTIN; COBOS, 2007; MENGISTU *et al.*, 2007; SANTOS; PHILLIP, 2009; DIOGO *et al.*, 2010; LI, 2011). Todavia, no presente levantamento foi encontrado como endofítico em folhas sem lesões.

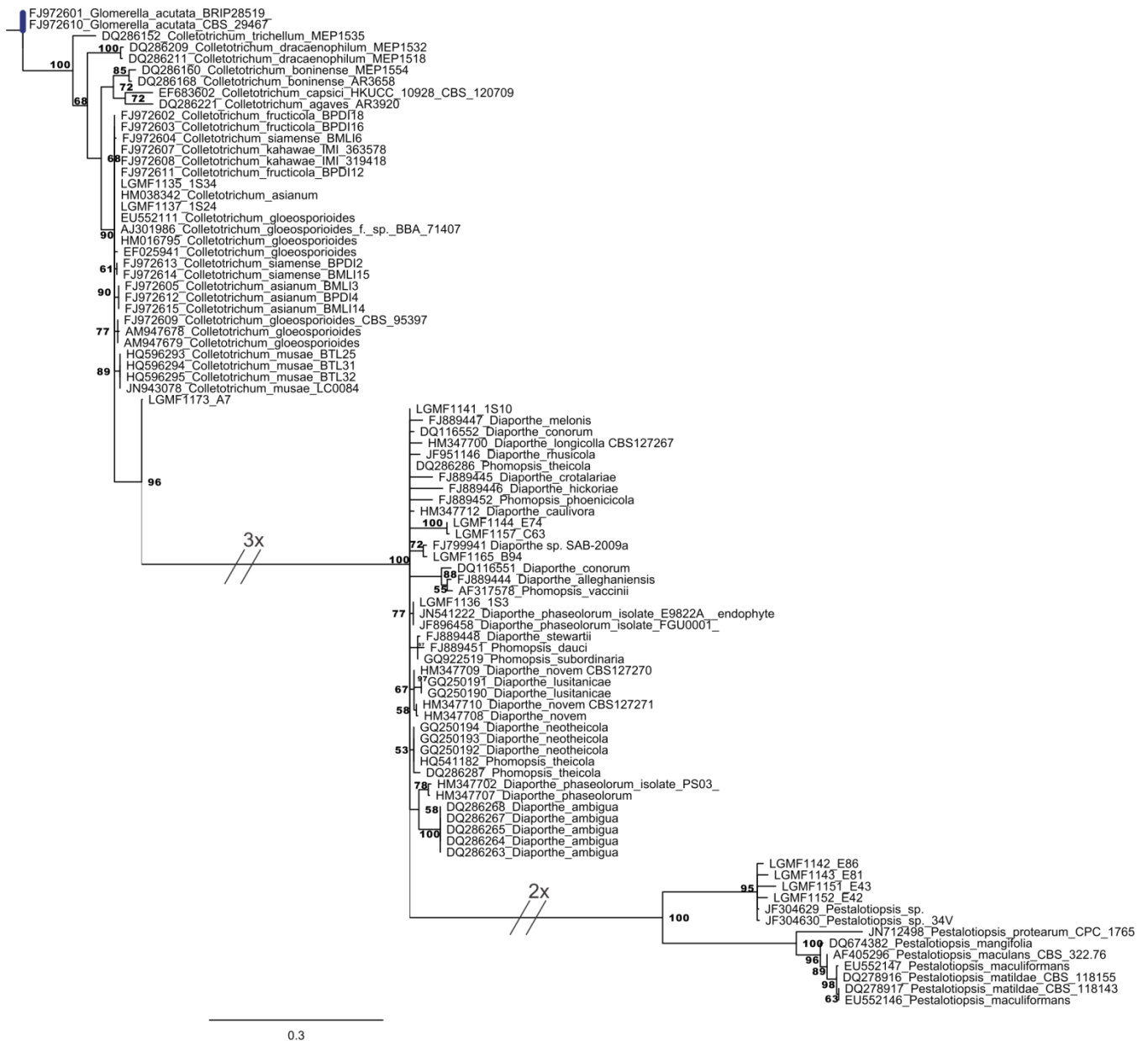


Figura 4 - Árvore filogenética do gene ITS com isolados pertencentes a Classe Sordariomycetes obtida através da análise de máxima verossimilhança com 10.000 repetições e enraizada com grupo do gênero *Glomerella*.

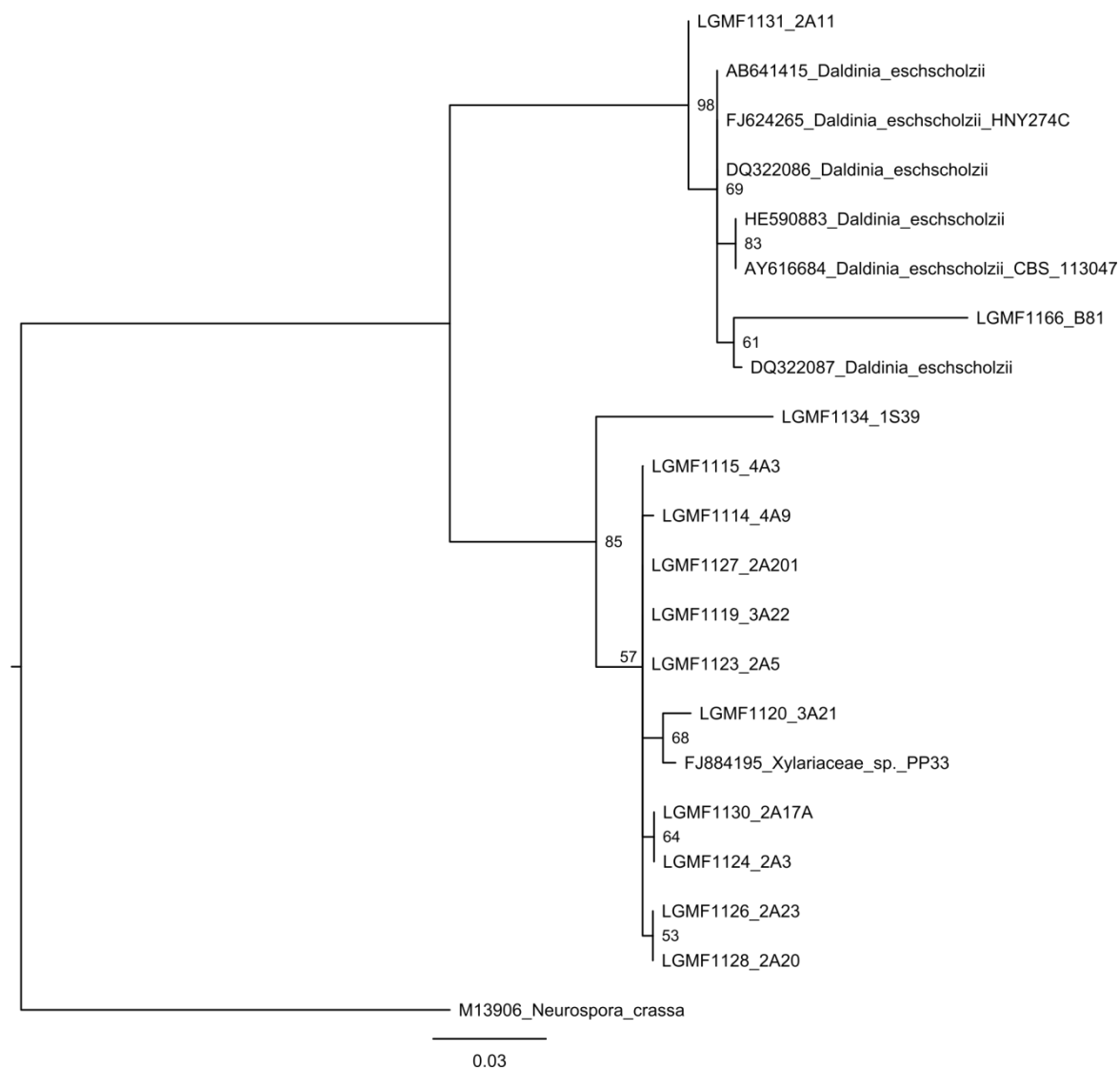


Figura 5 - Árvore filogenética do gene ITS com isolados do gênero *Daldinia* obtida através da análise de máxima verossimilhança com 10.000 repetições e enraizada na espécie *Neurospora crassa*.

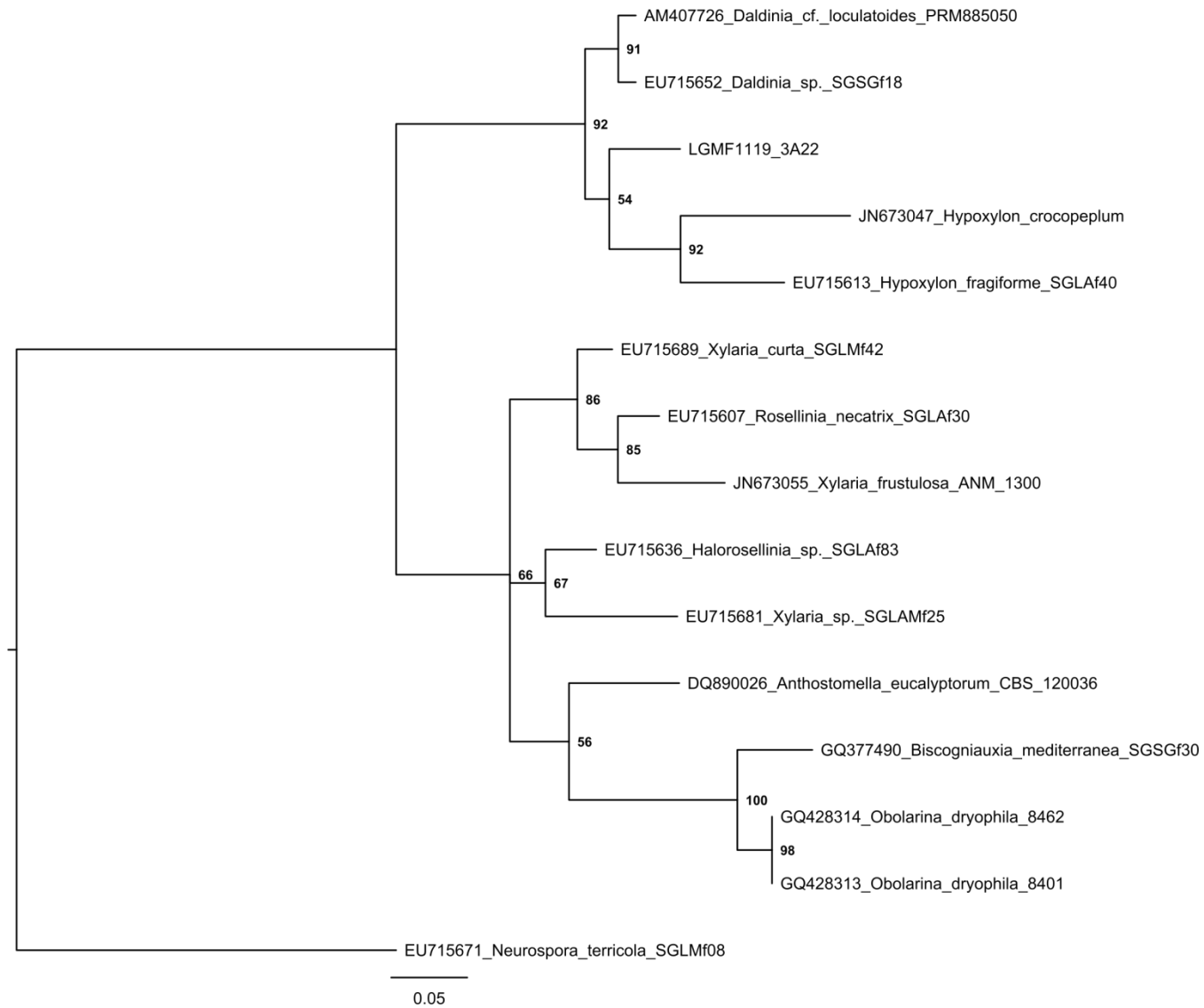


Figura 6 - Árvore filogenética, realizada através da análise combinada dos genes ITS e 28s, com isolados da família *Xylariaceae* obtida através da análise de máxima verossimilhança com 10.000 repetições e enraizada na espécie *Neurospora terricola*.

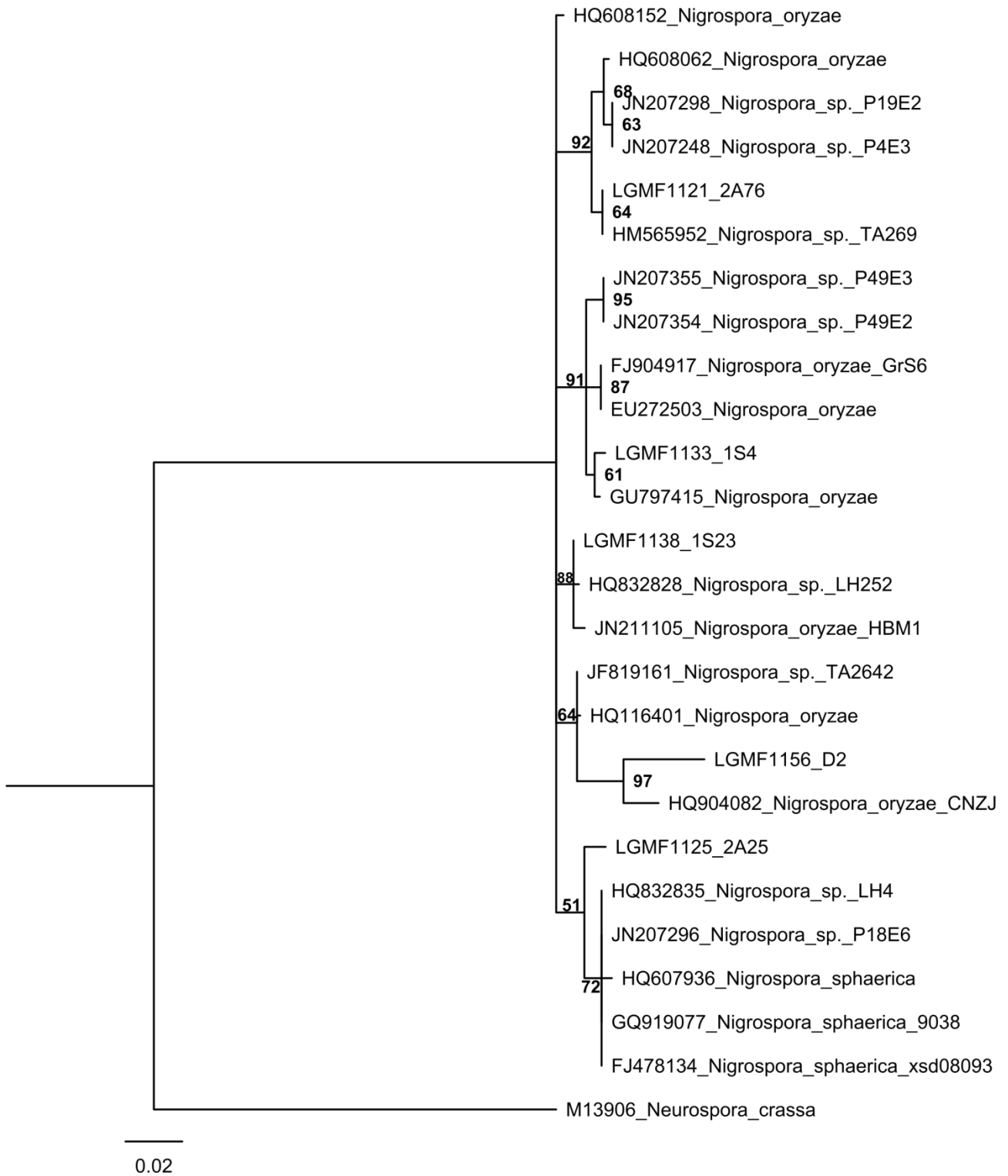


Figura 7 - Árvore filogenética do gene ITS com isolados pertencentes ao gênero *Nigrospora* obtida através da análise de máxima verossimilhança com 10.000 repetições e enraizada na espécie *Neurospora crassa*.

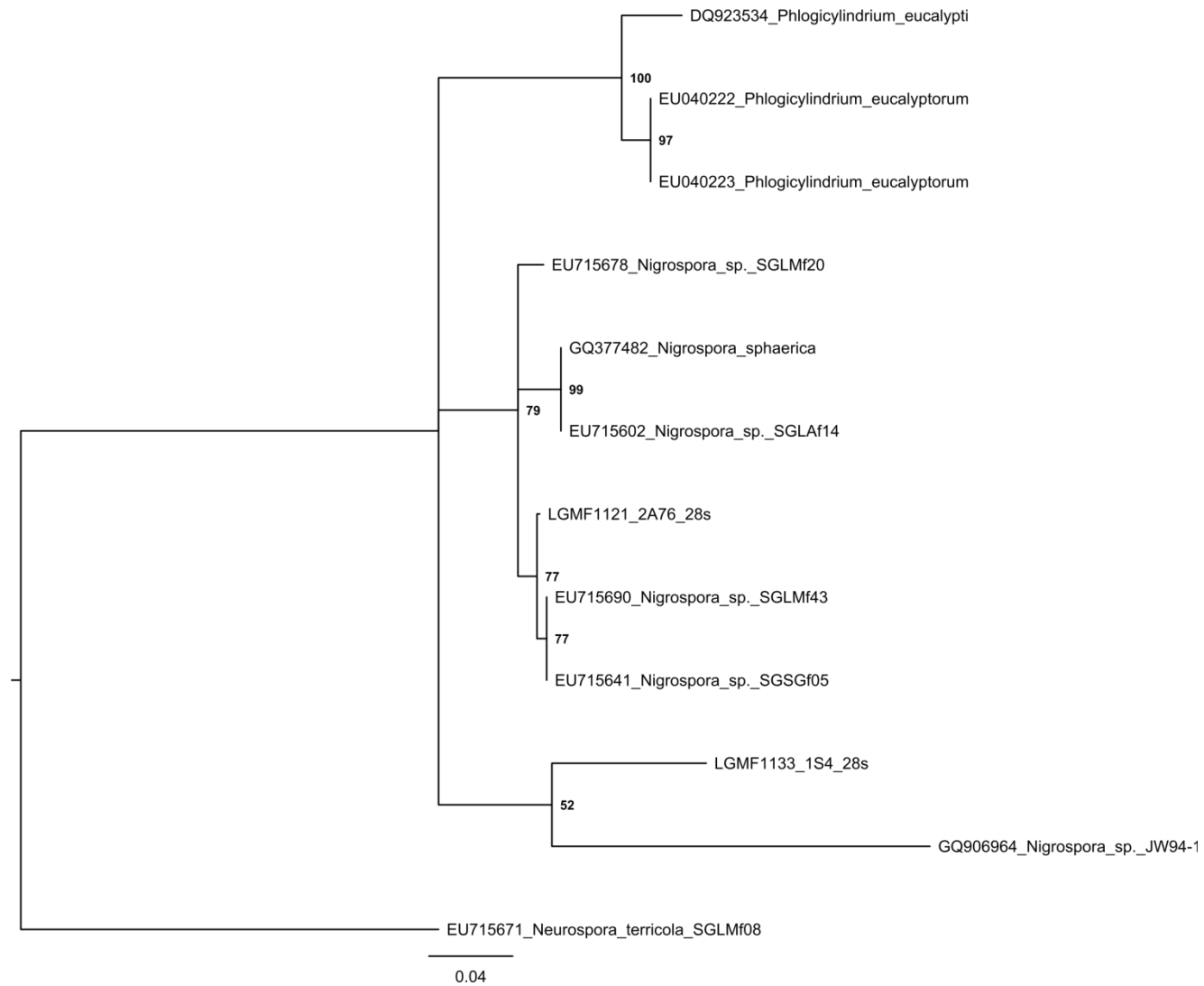


Figura 8 - Árvore filogenética, realizada através da análise combinada dos genes ITS e 28s, com isolados do gênero *Nigrospora* obtida através da análise de máxima verossimilhança com 10.000 repetições e enraizada na espécie *Neurospora terricola*.

Em outras espécies vegetais estes microrganismos são encontrados como endofítico como, por exemplo, no abacate (HAKIZIMANA *et al.*, 2011) algumas plantas da família *Orchidaceae* (SINGH *et al.*, 2011) e vegetais de mangue (XIAOLING *et al.*, 2010). Quanto a região ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA é recomendado o seu uso na identificação somente até ao nível taxonômico de gênero (DIOGO *et al.*, 2010), quando utilizado para interpretar relações específicas, principalmente na tentativa de separação entre o Teleomorfo (*Diaporthe*) e o Anamorfo (*Phomopsis*) é altamente recomendado a utilização de análise multigênica (SANTOS *et al.*, 2010).

Os isolados da Classe Dothideomycetes analisados neste trabalho, incluem cinco gêneros, *Phyllosticta*, *Pseudofusicoccum*, *Neofusicoccum*, *Cladosporium* e *Mycosphaerella* (Figura 9 e Figura 10). Esta Classe também é uma Classe dominante nos isolamentos de fungos endofíticos (PORRAS-ALFARO; BAYMAN, 2011).

Phyllosticta recentemente teve suas relações filogenéticas reorganizadas e algumas espécies antes consideradas Teleomorfo de *Guignardia*, agora são o Anamorfo *Phyllosticta*. Este fato se deve a tendência da comunidade científica mundial em adotar apenas um único nome para cada espécie de fungo, graças às elucidações fornecidas pelas ferramentas moleculares (TAYLOR, 2011). Estas mudanças incluem isolados do presente estudo, como aqueles identificados pertencentes a espécie *Guignardia mangiferae* que agora passam a ser denominadas de *Phyllosticta capitalensis* (GLIENKE *et al.*, 2011).

Porém a melhor forma de diferenciação entre estes organismos é a análise multigênica, como a realizada por GLIENKE *et al.* (2011) com o suporte das características morfológicas. Os isolados que na árvore filogenética são agrupados com *P. capitalensis* possuem os conídios característicos desta espécie (Figura 11 - a).

Os isolados LGMF1193, LGMF1196 e LGMF1172 são possíveis novas espécies pertencentes ao gênero *Phyllosticta* e requerem a análise de outros genes e a indução da produção de estruturas de reprodução para essa confirmação.

Os isolados LGMF1122 e LGMF1118 estão agrupados na Figura 9 com a espécie *Pseudofusicoccum stromaticum* e o isolado LGMF1116 com a espécie *Neofusicoccum grevillea*. Os gêneros *Pseudofusicoccum* e *Neofusicoccum* fazem parte da Família *Botryosphaeriaceae* e ambos anteriormente pertenciam ao gênero *Fusicoccum* e foram realocados em novos gêneros devido a diferenças morfológicas em seus conídios (CROUS *et al.*, 2006).

Outras espécies destes gêneros são encontradas como endófitos e patógenos em espécies vegetais lenhosas como *Eucalyptus* e *Acacia* (MOHALI *et al.*, 2007; PÉREZ *et al.*, 2010). Os fungos patogênicos causam graves problemas econômicos em linhagens de *Pinus* comerciais na América do Sul. Neste estudo estes microrganismos foram isolados como endófitos em folhas frescas, e a identificação de suas espécies foi feita utilizando a região ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA, assim como no trabalho de Mohali, Sari *et al* (2006).

Linhagens do gênero *Cladosporium* (Figura 9) foram isolados como endófito em diversos vegetais, e algumas espécies do gênero são isoladas de amostras de ar atmosférico e amostras de solo. As espécies que formam este gênero quando isolados como endófitos ou patogênicas em vegetais, são identificadas de acordo com seu hospedeiro, porém estudos filogenéticos com análises da região ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA e do gene da beta-tubulina comprovaram que existem espécies que são muito relacionadas e formam um complexo (BENSCH *et al.*, 2010). A região ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA mostrou-se eficiente na identificação e primeira detecção de *C. oxysporum* na Coreia (PAUL; YU, 2008) e para solucionar as relações entre outras espécies do gênero (ZALAR *et al.*, 2007; HU, XIAOYAN *et al.*, 2011).

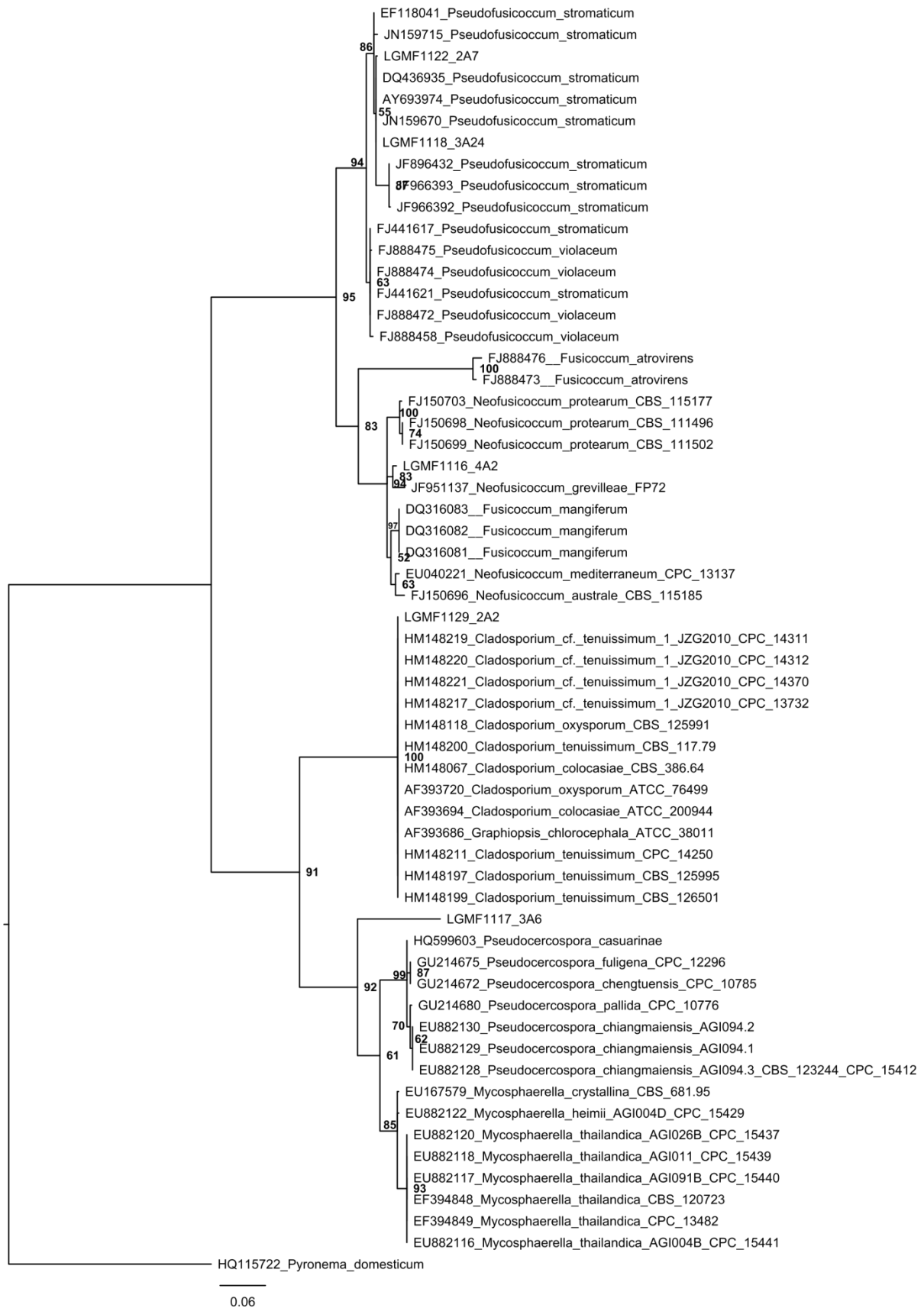


Figura 9 - Árvore filogenética com isolados pertencentes ao filo Dothideomycetes obtida através da análise de máxima verossimilhança com 10.000 repetições e enraizada na espécie *Pyronema domesticum*.

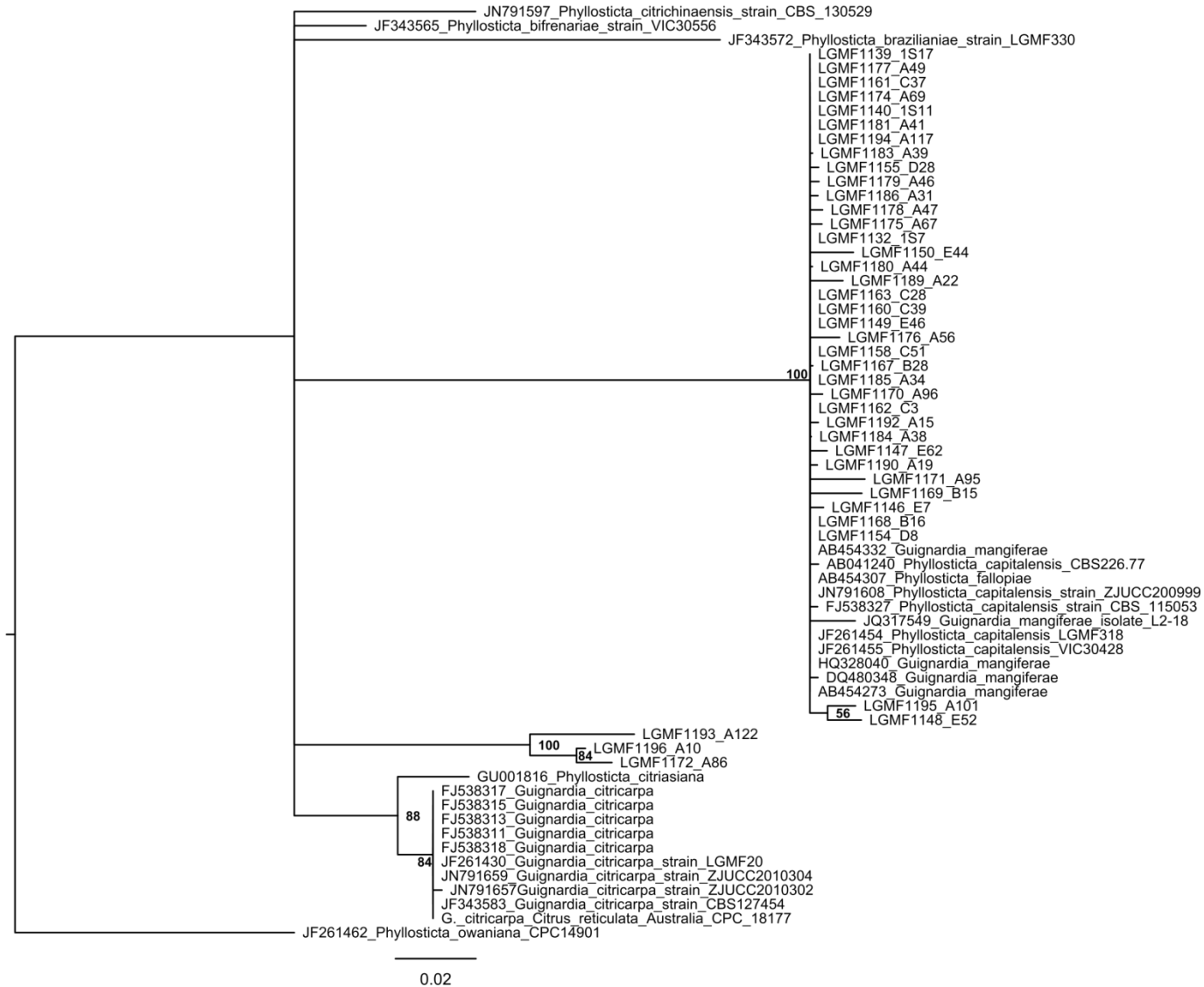


Figura 10 - Árvore filogenética com isolados pertencentes ao gênero *Phyllosticta* obtida através da análise de máxima verossimilhança com 10.000 repetições e enraizada na espécie *Phyllosticta owaniana*.

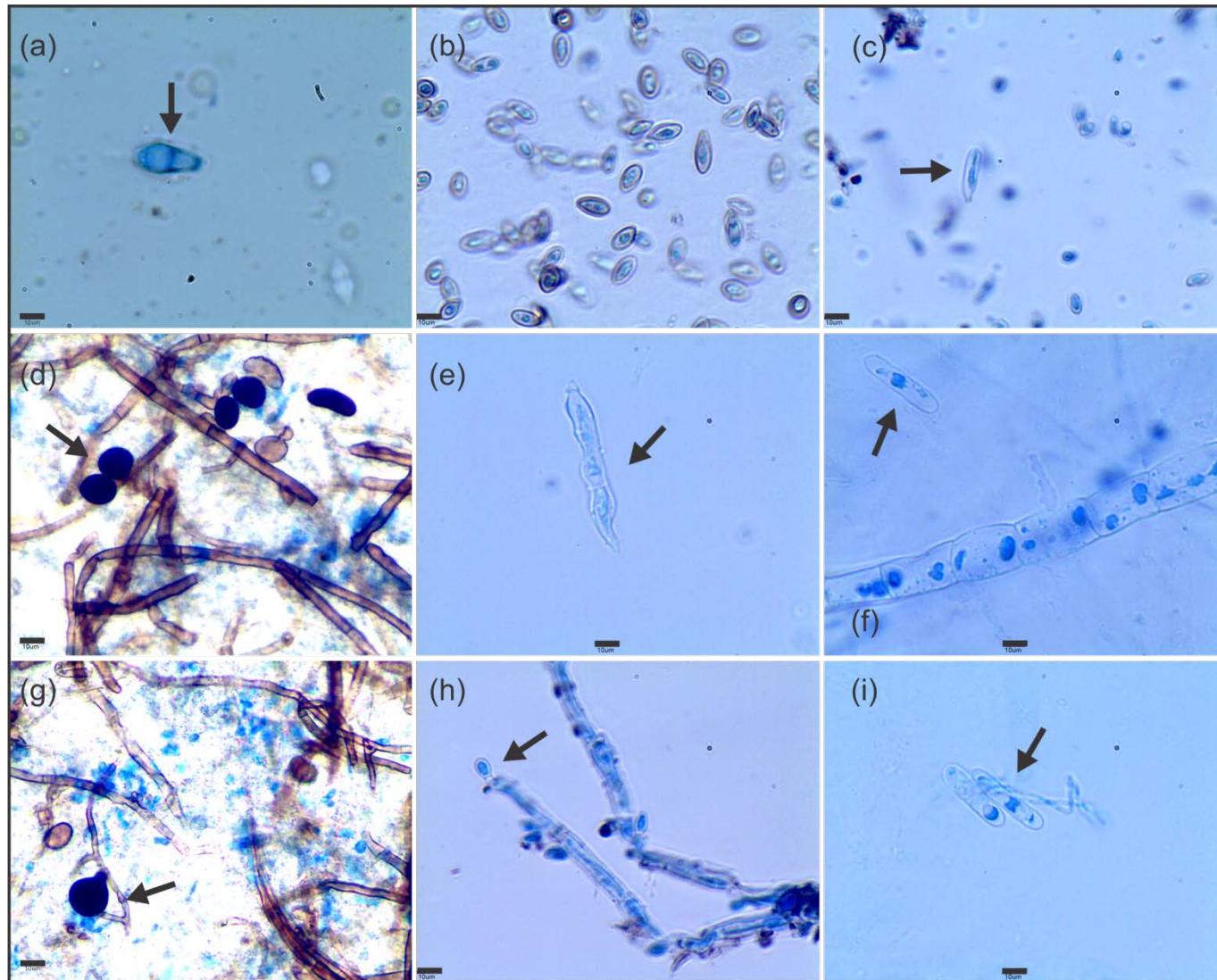


Figura 11 – Estruturas microscópicas dos isolados endofíticos de *Vochysia divergens* aos 21 dias de crescimento em estufa a 28° C e corados com lactofenol – (a) conídio de *Phyllosticta capitalensis* (LGMF1139); (b) conídios de *Daldinia* (LGMF1166); (c) (h) conídios de *Xylariaceae* (LGMF1134); (d) (g) conídios de *Nigrospora* (LGMF1131); (e) ascósporo de *Mycosphaerella* (LGMF1117); (f) (i) conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* (LGMF1173) – barra de escala = 10µm.

Mycosphaerella (Figura 9) é um grande complexo, que abriga a gigantesca quantidade de aproximadamente 10.000 espécies, quando são contabilizados também os seus Anamorfos, e sem dúvida, para resolver este complexo, não basta somente a análise filogenética de um único gene, sendo assim, faz se imprescindível a análise multigênica (CROUS *et al.*, 2009; HUNTER, GAVIN *et al.*, 2011).

Este gênero assim como *Pseudofusicoccum* e *Neofusicoccum* também é responsável por severas perdas no cultivo de *Eucalyptus*, principalmente nas regiões tropicais onde este vegetal foi introduzido (BURGESS *et al.*, 2007). A identificação através das estruturas microscópicas é uma ferramenta útil na identificação, como o ascósporo na Figura 11 (e) – em conjuntos com os dados moleculares (CROUS *et al.*, 2004).

4. Conclusão

O estudo obteve sucesso no isolamento e identificação de fungos endofíticos provenientes de folhas de *V. divergens* localizadas no Pantanal do Mato Grosso do Sul. As plantas analisadas são colonizadas por fungos pertencentes a diferentes filos do Reino Fungi, que são os *Basidiomycota* e *Ascomycota*.

Foram isolados e identificados cinco espécies que são respectivamente, *Antrodia sinuosa* (1%), *Irpex lacteus* (1%), *Peniophora laxitexta* (1%), *Phyllosticta capitalensis* (49%), *Neofusicoccum grevillea* (1%) e *Pseudofusicoccum stromaticum* (2%). Vinte e cinco isolados foram identificados ao nível de gênero, que são: *Polyporus* (1%), *Daldinia* (49%), *Nigrospora* (6%), *Colletotrichum* (4%), *Phomopsis/Diaporthe* (6%), *Pestalotiopsis* (5%), *Phyllosticta* (4%), *Cladosporium* (1%) e *Myscosphaerella*. Onze isolados pertencem a Família *Xylariaceae* (13%).

Faz-se necessária a realização da análise de outros genes para confirmação destes resultados e obtenção de maiores resoluções filogenéticas como, por exemplo, para a família *Xylariaceae* em que apenas um gênero foi identificado. E para os isolados que foram identificados somente até o nível de gênero chegar ao nível de espécie.

5. Referências

- ALTSCHUL, S. F. BLAST Algorithm. **ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES**, p. 1-4, 2005. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/npg.els.0005253>>. .
- ARIEIRA, J.; NUNES DA CUNHA, C. Fitossociologia de uma floresta inundável monodominante de *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae), no Pantanal Norte, MT, Brasil. **Acta bot. bras.**, v. 20, n. 3, p. 569-580, 2006.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2-3, p. 51-66, 2007.
- ARNOLD, A. E.; HENK, D. A.; EELLS, R. L.; LUTZONI, F.; VILGALYS, R. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. **Mycologia**, v. 99, n. 2, p. 185–206, 2007.
- ARNOLD, A. E.; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, v. 88, n. 3, p. 541–549, 2007. Eco Soc America. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17503580>>. Acesso em: 11/12/2011.
- BANERJEE, D. DUTTA. Endophytic fungal diversity in tropical and subtropical plants. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 54–62, 2011. Disponível em: <<http://docsdrive.com/pdfs/academicjournals/jm/2011/54-62.pdf>>. Acesso em: 11/12/2011.
- BENSCH, K.; GROENEWALD, J. Z.; DIJKSTERHUIS, J. et al. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). **Studies in mycology**, v. 67, p. 1-94, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2945380&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 4/10/2011.
- BURGESS, T. I.; BARBER, P. A.; SUFAATI, S. et al. *Mycosphaerella* spp. on Eucalyptus in Asia: new species, new hosts and new records. **Fungal Diversity**, v. 24, p. 135–157, 2007. Fungal Diversity Press. Disponível em: <<http://researchrepository.murdoch.edu.au/1568/>>. Acesso em: 12/12/2011.
- CHIU, H.-H. Phylogenetic analysis of *Antrodia* species and *Antrodia camphorata* inferred from internal transcribed spacer region. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 91, n. 3, p. 267-76, 2007.
- CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; PONGPANICH, K. et al. Cryptic speciation and host specificity among *Mycosphaerella* spp. occurring on Australian *Acacia* species grown as exotics in the tropics. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 457–469, 2004. Disponível em: <[http://www.cbs.knaw.nl/publications/1050/043-Cryptic speciation and host specificity among Mycosphaerella spp. occurring on Australian Acacia species grown as exotics in the tropics.pdf](http://www.cbs.knaw.nl/publications/1050/043-Cryptic%20speciation%20and%20host%20specificity%20among%20Mycosphaerella%20spp.%20occurring%20on%20Australian%20Acacia%20species%20grown%20as%20exotics%20in%20the%20tropics.pdf)>. Acesso em: 12/12/2011.

CROUS, P. W.; SLIPPERS, BERNARD; WINGFIELD, MICHAEL J; et al. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in mycology**, v. 55, n. 1915, p. 235-53, 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2104729&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

CROUS, P. W.; SUMMERELL, B. A; CARNEGIE, A J. et al. Unravelling Mycosphaerella: do you believe in genera? **Persoonia**, v. 23, p. 99-118, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2802725&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27/6/2011.

DAYARAM, P.; DASGUPTA, D. Decolorisation of synthetic dyes and textile wastewater using Polyporus rubidus. **Journal of Environmental Biology**, v. 29, n. 6, p. 831–836, 2008. Disponível em: <http://www.jeb.co.in/journal_issues/200811_nov08/paper_03.pdf>. Acesso em: 11/12/2011.

DIOGO, E. L. F.; SANTOS, J. M.; PHILLIPS, ALAN J. L. Phylogeny, morphology and pathogenicity of Diaporthe and Phomopsis species on almond in Portugal. **Fungal Diversity**, v. 44, n. 1, p. 107-115, 2010. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s13225-010-0057-x>>. Acesso em: 31/10/2011.

FARR, D. F.; AIME, M. C.; ROSSMAN, AMY Y; PALM, M. E. Species of Colletotrichum on Agavaceae. **Mycological Research**, v. 110, n. 12, p. 1395-1408, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756206002644>>. .

FUKUSHIMA, T.; TANAKA, M.; GOHBARA, M.; FUJIMORI, T. Phytotoxicity of three lactones from Nigrospora sacchari. **Phytochemistry**, v. 48, n. 4, p. 625–630, 1998. Elsevier. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942297010236>>. Acesso em: 4/12/2011.

GAZIS, R.; CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (Hevea brasiliensis) in Peru. **Fungal Ecology**, v. 3, n. 3, p. 240-254, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1754504809001093>>. Acesso em: 2/8/2011.

GLIENKE, C.; PEREIRA, O. L.; STRINGARI, D. et al. Endophytic and pathogenic Phyllosticta species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 26, n. 1, p. 47-56, 2011. Disponível em: <<http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=0031-5850&volume=26&issue=1&spage=47>>. Acesso em: 28/9/2011.

GUO, B.; WANG, Y; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2011.

MAIK Nauka/Interperiodica distributed exclusively by Springer Science+Business Media LLC. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1134/S0003683808020026>>. Acesso em: 19/7/2011.

HAKIZIMANA, J.; GRYZENHOUT, M.; COUTINHO, T.; BERG, N. VAN DEN. Endophytic diversity in *Persea americana* (avocado) trees and their ability to display biocontrol activity against *Phytophthora cinnamomi*. **worldavocadocongress2011.com**, p. 1-10, 2011. Disponível em: <[http://worldavocadocongress2011.com/userfiles/file/Noelani van den Berg 1500-1520.pdf](http://worldavocadocongress2011.com/userfiles/file/Noelani%20van%20den%20Berg%201500-1520.pdf)>. Acesso em: 12/12/2011.

HAWKSWORTH, D. L.; ROSSMAN, A.Y. Where Are All the Undescribed Fungi? **Phytopathology**, v. 87, n. 9, p. 888-891, 1997. Scientific Societies. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.9.888>>. .

HESS, S. C.; MONACHE, F. D. Divergioic Acid, a Triterpene from *Vochysia divergens*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 10, n. 2, p. 104-106, 1999.

HONDA, N. K.; CRUZ, A. B.; MESSANA, I. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, p. 97-100, 1995.

HOOG, G. S. DE; BOWMAN, B.; GRASER, Y. et al. Molecular phylogeny and taxonomy of medically important fungi. **Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 36 Suppl 1, p. 52-56, 1998. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands. Disponível em: <<http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/9988492>>. .

HU, H.; JEEWON, R.; ZHOU, D.; ZHOU, T.; HYDE, K. D. Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp.: evidence from rDNA and β -tubulin gene phylogenies. **Fungal Diversity**, v. 24, n. 1, p. 1–22, 2007. Disponível em: <<http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/24-1.pdf>>. Acesso em: 11/12/2011.

HU, X.; XI, L.; LU, H. et al. Phylogenetic analysis of dematiaceous fungi isolated from the soil of Guangdong, China. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 20, p. 3310–3316, 2011. Disponível em: <[http://www.academicjournals.org/AJMR/PDF/pdf2011/30 Sep/Hu et al.pdf](http://www.academicjournals.org/AJMR/PDF/pdf2011/30%20Sep/Hu%20et%20al.pdf)>. Acesso em: 12/12/2011.

HUANG, W.; CAI, Y.; SURVESWARAN, S. et al. Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species. **Fungal Diversity**, v. 36, p. 69-88, 2009. Disponível em: <<http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD36-5.pdf>>. Acesso em: 11/12/2011.

HUNTER, GAVIN C.; CROUS, P. W.; CARNEGIE, A. J.; BURGESS, TREENA I.; WINGFIELD, MICHAEL J. *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* diseases of *Eucalyptus*; easily confused and with serious consequences. **Fungal Diversity**, v. 50, n. 1, p. 145-166, 2011. Disponível em:

<<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s13225-011-0131-z>>. Acesso em: 4/12/2011.

HYDE, K. D.; CAI, L.; CANNON, P. F.; et al. Colletotrichum – names in current use. **Fungal Diversity**, v. 39, n. November, p. 147-182, 2009. Disponível em: <[http://www.cbs.knaw.nl/Research/CrousLab/publications/hyde etal 2009.pdf](http://www.cbs.knaw.nl/Research/CrousLab/publications/hyde%20etal%202009.pdf)>. Acesso em: 11/12/2011.

HYDE, K. D.; CAI, L.; MCKENZIE, E. H. C. et al. Colletotrichum: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 1-17, 2009.

JEEWON, R.; LIEW, E. Phylogenetic evaluation of species nomenclature of Pestalotiopsis in relation to host association. **Fungal Diversity**, p. 39-55, 2004. Disponível em: <<http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/17-4.pdf>>. Acesso em: 11/12/2011.

JUNK, W. J.; BARLEY, P. B.; SPARKS, R. E. The Flood Pulse Concept in River-Floodplain Systems. **Proceedings of the International Large River Symposium. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.**, v. 106, 1989.

JUNK, W. J.; BROWN, M.; CAMPBELL, I. et al. The comparative biodiversity of seven globally important wetlands: a synthesis. **Aquatic Sciences - Research Across Boundaries**, v. 68, n. 3, p. 400-414, 2006. Birkhäuser Basel. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00027-006-0856-z>>. .

KARNCHANATAT, A.; PETSOM, A.; SANGVANICH, P. et al. Purification and biochemical characterization of an extracellular beta-glucosidase from the wood-decaying fungus Daldinia eschscholzii (Ehrenb.:Fr.) Rehm. **FEMS microbiology letters**, v. 270, n. 1, p. 162-70, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17439636>>. Acesso em: 11/12/2011.

KIM, J. C.; CHOI, G. J.; PARK, J. H.; KIM, H. T.; CHO, K. Y. Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from Nigrospora sphaerica. **Pest management science**, v. 57, n. 6, p. 554-9, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11407033>>. Acesso em: 4/12/2011.

KIM, S. Y.; PARK, S. Y.; JUNG, H. S. Phylogenetic classification of Antrodia and related genera based on ribosomal RNA internal transcribed spacer sequences. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 475–481, 2001. THE KOREAN SOCIETY FOR APPLIED MICROBIOLOGY. Disponível em: <[http://plaza.snu.ac.kr/~minervas/pdf/jmb11\(475\).pdf](http://plaza.snu.ac.kr/~minervas/pdf/jmb11(475).pdf)>. Acesso em: 10/12/2011.

KIM, S. Y.; PARK, S.; KO, K.; JUNG, H. Phylogenetic analysis of Antrodia and related taxa based on partial mitochondrial SSU rDNA sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 83, n. 1, p. 81–88, 2003. Springer. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12755484>>. Acesso em: 10/12/2011.

LANDVIK, S. Neolecta, a fruit-body-producing genus of the basal ascomycetes, as shown by SSU and LSU rDNA sequences. **Mycological Research**, v. 100, n. 2, p. 199-202, 1996.

LI, S. Phomopsis seed decay of soybean. **Soybean—Molecular aspects of breeding. Intech Publisher, Vienna, Austria**, p. 277–292, 2011. Disponível em: <http://www.intechopen.com/source/pdfs/14938/InTech-Phomopsis_seed_decay_of_soybean.pdf>. Acesso em: 12/12/2011.

LÖYTYNOJA, A.; GOLDMAN, N. An algorithm for progressive multiple alignment of sequences with insertions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 30, p. 10557-62, 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1180752&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

MARTIN, M. T.; COBOS, R. Identification of fungi associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain). **Phytopathologia Mediterranea**, v. 46, n. 1, p. 18–25, 2007. Disponível em: <<http://www.fupress.net/index.php/pm/article/view/1854/1789>>. Acesso em: 12/12/2011.

MARTINEZ-LUIS, S.; CHERIGO, L.; HIGGINBOTHAM, S. et al. Screening and evaluation of antiparasitic and in vitro anticancer activities of Panamanian endophytic fungi. **INTERNATIONAL MICROBIOLOGY**, v. 14, p. 95–102, 2011. Disponível em: <http://www.im.microbios.org/1402/04_095_MartinezLuis.pdf>. Acesso em: 11/12/2011.

MENGISTU, A.; CASTLEBURY, L. A.; ROSSMAN, A Y; SMITH, J. R.; REDDY, K. N. Isolates of Diaporthe-Phomopsis from weeds and their effect on soybean. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 29, n. 3, p. 283-289, 2007. Taylor & Francis. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/07060660709507471>>. .

MINTER, D. Fungi: the orphans of Rio. **International Society for Fungal Conservation**, v. 1, n. 2, p. 27-31, 2010.

MOHALI, S.; SLIPPERS, BERNARD; WINGFIELD, M.J. Identification of Botryosphaeriaceae from Eucalyptus, Acacia and Pinus in Venezuela. **Fungal Diversity**, v. 25, p. 103–125, 2007. Disponível em: <<http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/25-7.pdf>>. Acesso em: 12/12/2011.

MOHALI, SARI; SLIPPERS, BERNARD; WINGFIELD, MICHAEL J. Two new Fusicoccum species from Acacia and Eucalyptus in Venezuela, based on morphology and DNA sequence data. **Mycological research**, v. 110, n. Pt 4, p. 405-13, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16621494>>. Acesso em: 2/8/2011.

MORAKOTKARN, D.; KAWASAKI, H.; SEKI, T. Molecular diversity of bamboo-associated fungi isolated from Japan. **FEMS microbiology letters**, v. 266, n. 1, p. 10-9, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17092298>>. Acesso em: 9/12/2011.

OKANE, I.; SRIKITIKULCHAI, P.; TOYAMA, K. et al. Study of endophytic Xylariaceae in Thailand: diversity and taxonomy inferred from rDNA sequence analyses with saprobes forming fruit bodies in the field. **Mycoscience**, v. 49, n. 6, p. 359-372,

2008. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10267-008-0440-6>>. Acesso em: 2/8/2011.

ORACHAIPUNLAP, K.; ROENGSUMRAN, S.; SIHANONTH, P. Diversity of endophytic fungi isolated from plant leaves of deciduous dipterocarp forest in Tak province. 47th Kasetsart University Annual Conference, Thailand, 17-20 March 2009. **Anais...** v. 43, p.182–188, 2009. Kasetsart University Research and Development Institute (KURDI). Disponível em: <http://kasetsartjournal.ku.ac.th/kuj_files/2010/A1003081246557656.pdf>. Acesso em: 15/10/2011.

PAUL, N. C.; YU, S. H. Two Species of Endophytic Cladosporium in Pine Trees in Korea. **Mycobiology**, v. 36, 2008. Disponível em: <[http://mycobiology.or.kr/Upload/files/MYCOBIOLOGY/36\(4\) 211-216.pdf](http://mycobiology.or.kr/Upload/files/MYCOBIOLOGY/36(4) 211-216.pdf)>. Acesso em: 12/12/2011.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, v. 1, n. 3, p. 185-196, 1993. John Wiley & Sons, Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/nt.2620010306>>. .

PORRAS-ALFARO, A.; BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Annual review of phytopathology**, v. 49, p. 291-315, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19400639>>. Acesso em: 18/8/2011.

PÉREZ, C. A.; WINGFIELD, M. J.; SLIPPERS, B.; ALTIER, N. A.; BLANCHETTE, R. A. Endophytic and canker-associated Botryosphaeriaceae occurring on non-native Eucalyptus and native Myrtaceae trees in Uruguay. **Fungal Diversity**, v. 41, n. 1, p. 53-69, 2010. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s13225-009-0014-8>>. Acesso em: 12/12/2011.

REFAEI, J.; JONES, E.; SAKAYAROJ, J. Endophytic fungi from Rafflesia cantleyi: species diversity and antimicrobial activity. **mycosphere.org**, 2011. Disponível em: <http://www.mycosphere.org/pdfs/MC2_4_No5.pdf>. Acesso em: 11/12/2011.

RIBEIRO, C. A. O.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic Toxicology**, v. 74, n. 1, p. 53-69, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X05001487>>. .

RIVERA-ORDUÑA, F. N.; SUAREZ-SANCHEZ, R. A.; FLORES-BUSTAMANTE, Z. R.; GRACIDA-RODRIGUEZ, J. N.; FLORES-COTERA, L. B. Diversity of endophytic fungi of *Taxus globosa* (Mexican yew). **Fungal Diversity**, v. 47, n. 1, p. 65–74, 2011. Springer. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/190876J287555388.pdf>>. Acesso em: 11/12/2011.

ROJAS, E. I.; REHNER, S. A.; SAMUELS, G. J. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. **Mycologia**, v. 102, n. 6, p. 1318-1338, 2010. Disponível em:

<<http://www.mycologia.org/content/102/6/1318.abstract>>. .

RUNGJINDAMAI, N.; PINRUAN, U.; CHOYEYKLIN, R.; HATTORI, T.; JONES, E. Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis and petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis*. **Thailand. Fungal Divers**, v. 33, n. 1991, p. 139–161, 2008. Disponível em:

<<http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/33-8.pdf>>. Acesso em: 9/12/2011.

SANTOS, J. M.; CORREIA, V. G.; PHILLIPS, ALAN J L. Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction in vitro and biological species definition. **Fungal Biology**, v. 114, n. 2-3, p. 255-270, 2010.

Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878614610000097>>. .

SANTOS, J.; PHILLIPS, A. Resolving the complex of *Diaporthe* (*Phomopsis*) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal. **Fungal Diversity**, v. 34, p. 111–125, 2009. Disponível em: <<http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD34-7.pdf>>. Acesso em: 12/12/2011.

SHIN, K. S. The role of enzymes produced by white-rot fungus *Irpelex lacteus* in the decolorization of the textile industry effluent. **JOURNAL OF MICROBIOLOGY-SEOUL**, v. 42, n. 1, p. 37–41, 2004. MICROBIOLOGICAL SOCIETY OF KOREA. Disponível em:

<<http://www.msk.or.kr/jsp/downloadPDF1.jsp?paperSeq=2003&fileName=421-05.pdf>>. Acesso em: 11/12/2011.

SHIN, K.; KIM, Y. Purification and characterization of manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpelex lacteus*. **JOURNAL OF MICROBIOLOGY-SEOUL**, v. 1, n. 11, p. 1829–1841, 2005. Wiley Online Library.

SINEGANI, A.; EMTIAZI, G.; HAJRASULIHA, S.; SHARIATMADARI, H. Biodegradation of some agricultural residues by fungi in agitated submerged cultures. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 10, p. 1058-1061, 2011.

Disponível em: <<http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/71367>>. Acesso em: 11/12/2011.

SINGH, S. K.; STROBEL, G. A.; KNIGHTON, B. et al. An endophytic *Phomopsis* sp. possessing bioactivity and fuel potential with its volatile organic compounds.

Microbial ecology, v. 61, n. 4, p. 729-39, 2011. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21331608>>. Acesso em: 19/8/2011.

STOYKE, G.; EGGER, K. N.; CURRAH, R. S. Characterization of sterile endophytic fungi from the mycorrhizae of subalpine plants. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, n. 10, p. 2009-2016, 1992. NRC Research Press. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1139/b92-250>>. .

STROBEL, G. A.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

SUKUMARAN, J.; HOLDER, M. T. DendroPy: a Python library for phylogenetic computing. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 26, n. 12, p. 1569-71, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421198>>. Acesso em: 27/7/2011.

SÁNCHEZ MÁRQUEZ, S.; BILLS, G. F.; ZABALGOGEAZCOA, I.; OTHERS. The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. **Fungal Diversity**, p. 171-195, 2007. The Mushroom Research Foundation. Disponível em: <<http://digital.csic.es/handle/10261/17021>>. Acesso em: 11/12/2011.

TALHINHAS, P.; SREENIVASAPRASAD, S.; NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H. Genetic and Morphological Characterization of *Colletotrichum acutatum* Causing Anthracnose of Lupins. **Phytopathology**, v. 92, n. 9, p. 986-96, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18944024>>. .

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21546353>>. Acesso em: 18/7/2011.

TANG, A.; JEEWON, R.; HYDE, K. D. A re-evaluation of the evolutionary relationships within the Xylariaceae based on ribosomal and protein-coding gene sequences. **Fungal Diversity**, v. 34, p. 127–155, 2009. Disponível em: <<http://fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD34-8.pdf>>. Acesso em: 11/12/2011.

TAVČAR, M.; SVOBODOVÁ, K.; KUPLENK, J.; NOVOTNÝ, Č.; PAVKO, A. Biodegradation of azo dye RO16 in different reactors by immobilized *Irpex lacteus*. **Acta Chim Slov**, v. 53, p. 338–343, 2006. Disponível em: <<http://acta.chem-soc.si/53/53-3-338.pdf>>. Acesso em: 11/12/2011.

TAYLOR, J. W. One Fungus = One Name : DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. , v. 2, n. 2, p. 113-120, 2011.

TEJESVI, M. V.; KINI, K. R.; PRAKASH, H. S.; SUBBIAH, V.; SHETTY, H. S. Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. **Fungal Diversity**, v. 24, p. 37–54, 2007. Disponível em: <<http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/24-3.pdf>>. Acesso em: 11/12/2011.

TEJESVI, M. V.; TAMHANKAR, S. A.; KINI, K. R. .; V.S., R.; PRAKASH, H. S. Phylogenetic analysis of endophytic *Pestalotiopsis* ethnopharmaceutically important medicinal trees species from. **Fungal Diversity**, p. 167-183, 2009.

TODA, H.; TAKADA, S.; ODA, M. et al. Gene cloning of an endoglucanase from the basidiomycete *Irpex lacteus* and its cDNA expression in *Saccharomyces cerevisiae*.

Bioscience, biotechnology, and biochemistry, v. 69, n. 7, p. 1262–1269, 2005. J-STAGE.

UREÑA-PADILLA, A R.; MACKENZIE, S. J.; BOWEN, B. W.; LEGARD, D. E. Etiology and Population Genetics of *Colletotrichum* spp. Causing Crown and Fruit Rot of Strawberry. **Phytopathology**, v. 92, n. 11, p. 1245-52, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18944251>>. Acesso em: 11/12/2011.

VEGA, F. E.; SIMPKINS, A.; AIME, M. C. et al. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawaii, Mexico and Puerto Rico. **Fungal Ecology**, v. 3, n. 3, p. 122-138, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1754504809000841>>. .

VILGALYS, R.; HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of several *Cryptococcus* species . **Microbiology**, v. 172, n. 8, 1990.

WANG, YU; GUO, L.-DONG. Taxonomic placement of sterile morphotypes of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis*(Pinaceae) in northeast China based on rDNA sequences. **Fungal Diversity**, v. 20, p. 235–260, 2005. Disponível em: <<http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/20-14.pdf>>. Acesso em: 11/12/2011.

WEI, J. G.; XU, T.; GUO, L. D. et al. Endophytic *Pestalotiopsis* species associated with plants of Podocarpaceae, Theaceae and Taxaceae in southern China. **Fungal Diversity**, v. 24, n. 1, p. 55–74, 2007. Disponível em: <<http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/24-4.pdf>>. Acesso em: 11/12/2011.

WHITE JR., J. F.; MORROW, A. C. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. **Mycologia**, v. 82 , p. 218-226, 1990.

XIAOLING, C.; XIAOLI, L.; SHINING, Z. et al. Cytotoxic and topoisomerase I inhibitory activities from extracts of endophytic fungi isolated from mangrove plants in Zhuhai, China. **Journal of Ecology and The Natural Environment**, v. 2, n. 2, p. 017–024, 2010. Disponível em: <[http://academicjournals.org/jene/PDF/Pdf2010/Feb/Xiaoling et al.pdf](http://academicjournals.org/jene/PDF/Pdf2010/Feb/Xiaoling%20et%20al.pdf)>. Acesso em: 12/12/2011.

ZALAR, P.; HOOG, G. S. DE; SCHROERS, H.-J. et al. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. **Studies in mycology**, v. 58, p. 157-83, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2104741&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 16/7/2011.

ZHANG, Q.-H.; TIAN, L.; ZHOU, L.-D. et al. Two new compounds from the marine *Nigrospora sphaerica*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 11, p. 962-966, 2009. Taylor & Francis. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10286020903339614>>. .

ZWICKL, D. J. **Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion** *Philosophy*, 2006. The University of Texas at Austin. Disponível em: <<http://gradworks.umi.com/32/46/3246095.html>>. .

6. CAPÍTULO 2

Fungos Endofíticos de *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae) no Controle Biológico de *Phyllosticta citricarpa*.

Hokama, Y. M., Gomes R.R., Savi D.C., Adamoski D.M., Possiede Y. M., Glienke C.

Resumo

Phyllosticta citricarpa é o agente causal da mancha preta do citros (MPC) e também responsável por grandes prejuízos a citricultura brasileira e mundial, possui um acelerado avanço global e já apresentou resistência aos fungicidas utilizados em campo. Por estes motivos, há urgência na busca por novos compostos que possam frear o avanço desta doença e o metabolismo secundário dos fungos endofíticos é alvo de intensas investigações. Neste estudo os metabólitos secundários dos fungos endofíticos de *V. divergens* são testados contra o fitopatógeno *P. citricarpa* e os extratos hidrofílicos de *Xylariaceae* inibiram com sucesso superior a 80% o crescimento micelial e produção de picnídios do fitopatógeno.

Palavras chave: endofíticos, cambará, MPC, *P. citricarpa*, bioprospecção e antagonismo.

Abstract

Phyllosticta citricarpa is the causal agent of citrus black spot (CBS) and also responsible for major damage to citrus in Brazil and other countries, this pathogen has a rapid global advance and it is resistant to the fungicides used in the field. For these reasons, there is an urgent search for new compounds that may curb the spread of this disease and the secondary metabolism of endophytic fungi are targets of intense research. In this study the secondary metabolites of endophytic fungi from *V. divergens* are tested against the citrus pathogen *P. citricarpa* and the hydrophilic extracts *Xylariaceae* successfully inhibit more than 80% of mycelial growth and pycnidial production of the pathogen.

Key words: endophytes, cambará, CBS, *P. citricarpa*, bioprospecting and antagonism.

1. Introdução

O fungo *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Van der Aa foi isolado em meados de 1895 em plantas cítricas na Austrália (BENSON, 1895), e depois disseminado por diversos países do mundo incluindo o Brasil (KOTZÉ, 1981; BAAYEN *et al.*, 2002). Recentemente teve suas relações taxonômicas revistas (GLIENKE *et al.*, 2011), e foi descrito na literatura como o agente causador da Mancha Preta do Citros (MPC). Esta doença é responsável por graves problemas a citricultura brasileira, sendo considerada uma praga quarentenária A1 pela União Europeia, um dos maiores compradores de citros do Brasil (SUTTON, 1966).

Em abril de 2010, a “Animal and Plant Health Inspection Service” (APHIS) confirmou a identificação da MPC no estado da Flórida, nos EUA, em laranjas comerciais do tipo valência, mostrando o avanço mundial da doença (SCHUBERT; SUTTON, 2010; APHIS, 2010).

Na safra 2009/2010, a produção brasileira foi de 397 milhões de caixas de laranja. A cadeia produtiva do citros arrecada US\$ 189 milhões em impostos para o Brasil, entretanto os gastos com defensivos agrícolas na cadeia produtiva do citros chegam a US\$ 288,2 milhões (NEVES *et al.*, 2010). Estes números comprovam a importância socioeconômica da citricultura para o Brasil, mas, também mostra que um montante significativo é aplicado para frear as perdas ocasionadas por fitopatógenos.

Este cenário é agravado pelo aparecimento de isolados de *P. citricarpa* resistentes aos fungicidas químicos que atualmente são aplicados nos pomares brasileiros, como o fungicida Benomyl® (POSSIEDE *et al.*, 2009).

Procurando solucionar o panorama exposto anteriormente e ao mesmo tempo diminuir o impacto ambiental promovido pelo uso de defensivos agrícolas químicos, a busca e implementação de controle biológico com substâncias de origem natural aumentou, principalmente a cerca de substâncias de origem fúngica (OWNLEY *et al.*, 2008; GAO *et al.*, 2010; HEYDARI; PESSARAKLI, 2010; ZHAO *et al.*, 2010; GUO *et al.*, 2011).

Com o intuito de facilitar esta procura por novos compostos, locais com alta diversidade de microrganismos estão sendo explorados. (HAWKSWORTH; ROSSMAN, A.Y., 1997; HAWKSWORTH *et al.*, 2009; BRAJESH KUMAR, 2010), por este motivo este estudo investigou uma área altamente diversa, o Pantanal sul-mato-grossense, esta região apresenta alta diversidade para vários organismos, como, vegetais (POTT; POTT, 2009; POTT *et al.*, 2011), invertebrados (FANTIN-CRUZ *et al.*, 2010; NICÁCIO; UCHÔA, 2011), peixes (TERESA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010) e mamíferos (NUNES; TOMAS, 2004; SANTOS, 2009; ALHO *et al.*, 2011) e nunca antes investigada quanto à presença de fungos endofíticos com potencial biotecnológico.

O objetivo do presente estudo foi investigar a existência de fungos endofíticos com potencial biotecnológico na planta *Vochysia divergens* Pohl, popularmente conhecida como cambará, este vegetal também é capaz de produzir substâncias com potencial antimicrobiano (HONDA *et al.*, 1995) e analisar a capacidade *in vitro* dos fungos endofíticos hospedados por este vegetal controlar o fitopatógeno *P. citricarpa*.

2. Métodos

2.1. Área de estudo e isolamento

A área de estudos, coleta e os métodos utilizados no isolamento dos endofíticos estão descritos conforme HOKAMA *et al.* no capítulo 1 deste trabalho.

2.2. Testes de Antagonismo *in vitro* contra o fitopatógeno *P. citricarpa*

2.2.1. Avaliação de metabólitos não voláteis

Foram utilizados 58 isolados endofíticos para realizar o teste de antagonismo contra o fungo *Phyllosticta citricarpa*, incluindo isolados da coleta realizada em 2008 e 2010. Para cada isolado foram feitas três repetições com um total amostral de 158 placas de teste, incluindo os controles negativos e positivos de *P. citricarpa* e parcelas perdidas.

A superfície do meio BDA (Batata – Dextrose – Agar) foi coberta, inclusive nas bordas, com discos de papel celofane (Ø11 cm) esterilizados. A seguir, foram inoculados no centro, sobre a superfície do papel celofane, discos de ágar (Ø12 mm) contendo micélio dos isolados endofíticos.

As placas foram incubadas por quatro dias a temperatura de 28°C com fotoperíodo de 12 horas, as placas controles receberam apenas o fitopatógeno *P. citricarpa* (linhagem LGMF06 - BALDASSARI *et al.*, 2007) depositado na micoteca pública do Laboratório de Genética de Microrganismo, Curitiba – PR, em todos os outros testes a mesma linhagem foi utilizada.

O diâmetro da colônia do isolado endofítico foi medido e a colônia foi removida juntamente com o papel celofane. As placas foram invertidas e foi adicionado aproximadamente 5 mL de clorofórmio na tampa, a fim de eliminar resíduos

estruturais dos endófitos. Após a evaporação do produto, foi inoculado um disco de micélio do fitopatógeno no centro da placa de Petri.

O potencial de inibição foi avaliado medindo-se o diâmetro das colônias e comparando com o controle negativo onde não houve adição de fungicidas. Nas placas de controle positivo foi utilizado fungicida Glifosinato (1,0 mg/mL).

As placas foram incubadas a 28°C sem fotoperíodo. Após 14 dias foi medido o crescimento das colônias e comparado com os controles, leituras subsequentes a 21 e 28 dias foram realizadas e posteriormente comparadas aos controles (MARTINS-CORDER; MELO, 1998).

2.2.2. Avaliação de metabólitos voláteis

A avaliação da ação de metabólitos voláteis dos endofíticos sobre o crescimento de *P. citricarpa* foi realizada utilizando o teste de antagonismo em cultivo pareado. Foram utilizados 58 isolados, para cada isolado foram feitas três repetições com um total amostral de 158 placas de teste, incluindo os controles negativos e positivos de *P. citricarpa* e parcelas perdidas.

Foram utilizadas Placas de Petri com divisória contendo meio BDA. Em uma das extremidades da placa foi inoculado um disco (Ø 12 mm) do fitopatógeno, na extremidade oposta foi inoculado um disco (Ø 12 mm) com a cultura do isolado endofítico a ser avaliado. As placas foram vedadas com filme PVC e incubadas a 28°C sem fotoperíodo.

O potencial de inibição foi avaliado medindo-se o diâmetro das colônias e comparando com o controle negativo onde não houve adição de fungicidas. Como controle positivo foi utilizado fungicida Glifosinato (1,0 mg/mL)

Após sete dias de crescimento foi avaliado o potencial de inibição medindo-se o diâmetro das colônias e leituras subsequentes a 14 e 21 dias foram realizados.

2.2.3. Obtenção dos extratos

Foram testados os isolados LGMF1119, LGMF1133 e LGMF1121, que apresentaram melhor desempenho quanto a inibição de *P. citricarpa* na avaliação de metabólitos não voláteis. Foram feitos dois frascos de cultura em Erlenmeyer para cada isolado, contendo 250 mL de caldo de batata pH 6,8. Os frascos, cada um contendo três discos com inóculo dos fungos endofíticos, foram armazenados em shaker durante 21 dias a temperatura de 28°C e 120 RPM (rotações por minutos).

Após o crescimento, as culturas foram filtradas com auxílio de papel filtro, funil de Buchner, kitassato e bomba de vácuo. O micélio retido no filtro de apenas um frasco de cada isolado foi macerado em uma solução de 30 mL de acetato de etila, filtrado e reservado para rotaevaporação.

O fluido filtrado de apenas um frasco de cada isolado foi enviado para liofilização sem nenhum tipo de manipulação e foram nomeados extratos brutos (eb). Após a liofilização destes fluidos, o material seco foi pesado e ressuspenso em água a uma concentração final de 10 mg/mL. Para esterilizar este material, foi realizada uma filtração em filtro 0,22 micrometros TPP®.

O fluido filtrado do frasco restante de cada isolado foi separado em duas fases por meio da adição de 250 mL de acetato de etila, sendo nomeadas respectivamente de porção hidrofílica (hfi), que corresponde aos metabólitos solubilizados na porção aquosa, e porção hidrofóbica (hfo), que são os metabólitos solubilizados na porção não aquosa.

A porção hidrofóbica (hfo) foi rotaevaporada para remoção do acetato de etila, e em seguida, o restante de material foi seco em estufa a 45°C. Em seguida o material foi pesado e ressuspendido em metanol a uma concentração final de 10 mg/mL. A solução utilizada para a maceração do micélio também passou pelo mesmo processo e foi nomeado macerado de micélio (mc).

A porção hidrofílica (hfi) foi liofilizada, e após este processo, pesada e ressuspendida em água Milli-Q autoclavada a uma concentração final de 10 mg/mL. O material foi também filtrado em filtro 0,22 micrometros TPP® para esterilização. A Figura 1 ilustra o aspecto de alguns extratos.

2.2.4. Teste de crescimento micelial

A avaliação da inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *P. citricarpa* foi realizada através da adição de 100 µL de cada extrato a placas de petri contendo meio BDA pH 5,8. Desta forma cada placa possuía um miligrama (1 mg) de extrato no meio. Para cada extrato de cada isolado foram feitas 10 repetições, totalizando uma amostra de 120 placas. As placas foram inoculadas com discos de ágar (Ø12 mm) contendo micélio do fitopatógeno.

As placas foram acondicionadas em estufa de crescimento em temperatura constante de 28°C e iluminação contínua. Foram feitas medições em centímetros

das colônias de *P. citricarpa*, traçando-se duas retas perpendiculares, as medições foram realizadas aos 14, 21 e 28 dias após a inoculação.

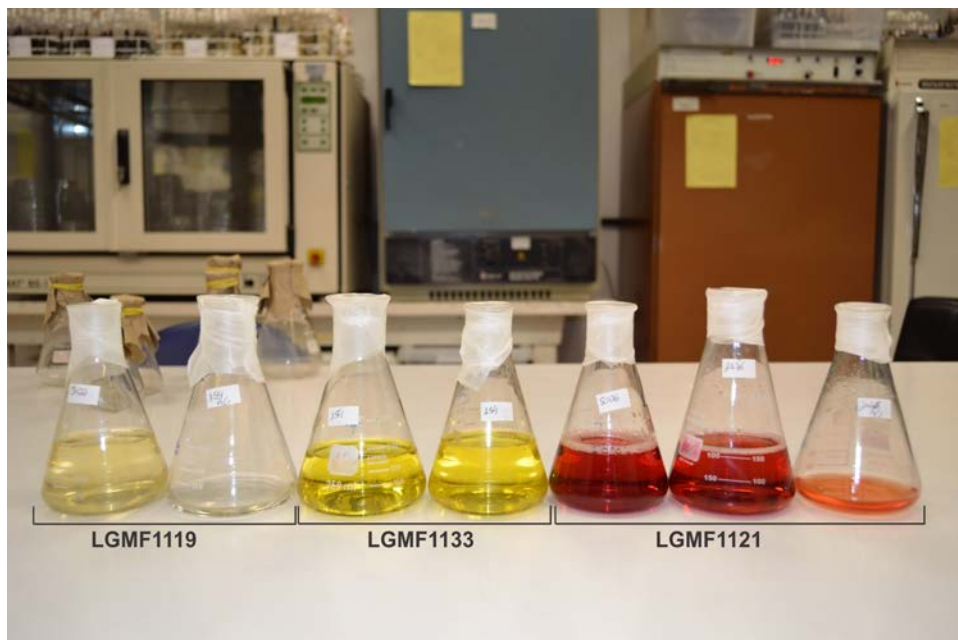


Figura 1 – Fluido filtrado das culturas de LGMF1119, LGMF1133 e LGMF1121.

2.2.5. Teste de produção de picnídios

A inibição da produção de picnídios de *P. citricarpa* foi avaliada através da adição de 10 μ L de cada extrato na parte superior de discos de folha de citros (\varnothing 48 mm). Os discos foram assepticamente colocados na superfície de placas de petri contendo meio agar-água. Em cada placa foram adicionados quatro discos, nas margens de cada disco três pequenos inóculos do fitopatógeno (1 mm²) foram semeados. A avaliação do experimento deu-se através da contagem do número de picnídios formados na superfície foliar após 21 dias confrontando estes com os controles negativos.

2.3. Testes e análises estatísticas

Para a análise dos dados e inferências estatísticas foi utilizado o *software* R, para aplicação de testes paramétricos: ANOVA – análise de variância - e Tukey; e testes não paramétricos: Kruskal-Wallis e Dunn. Assim como a estatística descritiva, teste de normalidade de Anderson-Darling e teste de igualdade de variâncias de Bartlett e Levene e construção do gráfico boxplot (DALGAARD, 2002).

3. Resultados

3.1. Análise dos metabólitos não voláteis

O Cambará por ser um vegetal capaz de produzir substâncias com atividade antimicrobiana e o Pantanal ser uma região altamente diversa tiveram os fungos endofíticos hospedados por este vegetal avaliados quanto seu potencial de controle biológico, e dos 58 isolados de fungos endofíticos estudados, três apresentaram inibição de 100% do crescimento do fitopatógeno *P. citricarpa* – LGMF1119, LGMF1133 e LGMF1121 (Tabela 1).

Tabela 1 - Média de crescimento em centímetros com desvio padrão e porcentagem de inibição de *Phyllosticta citricarpa* por isolados endofíticos, metabólitos não voláteis - * = somente uma amostra.

Tratamento	Média de crescimento		Porcentagem de inibição
LGMF06 (CN)	6,24	± 1,9	0%
LGMF06 (CP)	0	± 0	100%
LGMF1133	0	± 0	100%
LGMF1121	0	± 0	100%
LGMF1119	0	± 0	100%
A126	1,3	± 1	80%
Tratamento	Média de crescimento		Porcentagem de inibição

E23	1,4	±	0,5	77%
4a9	1,5	±	0,1	77%
E70	1,8	±	0,4	71%
3a25	1,9	±	0,9	70%
A109	2,1	±	0,5	66%
E33	2,2	±	0,4	65%
A128	2,2	±	0,5	64%
C60	2,3	±	0,7	64%
A158	2,4	±	0,1	61%
1s7	2,5	±	0,5	59%
E82	2,6	±	*	59%
2a25	2,7	±	0,8	57%
C44	2,7	±	0,6	56%
C63	2,8	±	0,4	55%
1s39	2,9	±	0,9	53%
E38	3,0	±	0,9	51%
D43	3,0	±	0,4	51%
B81	3,1	±	*	51%
B33	3,3	±	0,1	47%
C43	3,3	±	0,6	47%
A130	3,5	±	0,3	45%
A7	3,5	±	0	44%
E84	3,5	±	1,2	44%
B75	3,5	±	0,2	43%
A51	3,5	±	0,6	43%
B55	3,8	±	0,7	39%
A120	3,9	±	0,6	37%
C1	4,1	±	0,9	35%
D41	4,1	±	0,9	34%
E6	4,1	±	0,6	34%
1s23	4,1	±	1,8	34%
B94	4,2	±	1	33%
E81	4,2	±	0,4	33%
C5	4,2	±	0,9	33%
A171	4,5	±	0,1	27%
Tratamento	Média de crescimento			Porcentagem de inibição

E39	4,6	±	0,9	26%
B91	4,6	±	1,6	26%
E42	4,7	±	1,3	25%
A144	5,1	±	0,1	19%
E31	5,2	±	1,1	16%
2a11	5,2	±	0,7	16%
B84	5,4	±	0,3	14%
A5	5,4	±	1	13%
A119	5,5	±	*	12%
E32	5,5	±	1,4	11%
E74	5,6	±	2,4	10%
C25	5,9	±	2,7	6%
2a23	5,9	±	1	6%
3a6	6,0	±	0,6	4%
D60	6,7	±	1,8	0%
E43	8,1	±	1,3	0%
E86	7,0	±	1,4	0%

Na Tabela 1 estão os dados de crescimento micelial do controle negativo (LGMF06 sem tratamento), do controle positivo (LGMF06 acrescido de 1 mg/mL de meio de cultura do fungicida glifosinato) e dos diferentes tratamentos (LGMF06 acrescido com os diferentes metabólitos não voláteis provenientes dos endófitos) e observa-se uma grande diferença nas taxas de inibição entre os tratamentos (LGMF1133 = 100% e E86 = 0%) o que demonstra claramente uma resposta positiva na inibição do fitopatógeno, sendo os tratamentos estatisticamente diferentes $P < 0,001$ (Apêndice 2).

O teste de Dunn, também foi aplicado para confirmar o efeito de inibição, nele foram comparados os tratamentos que apresentaram porcentagem de inibição do fitopatógeno acima de 90%, sendo eles os isolados do gênero *Nigrospora* (LGMF1133 e LGMF1121), *Xylariaceae* (LGMF1119) e *Pseudofusicoccum* (LGMF1118), estes isolados não diferiram estatisticamente do controle positivo (Cp)

que possuía em sua composição glifosinato, antifúngico com ação reconhecida contra *P. citricarpa*. Em oposição estes quatro isolados apresentaram diferenças significativas contra o controle negativo (Cn) que não possuía aditivos no meio de cultura (Apêndice 3).

A ação inibitória apresentada pelos extratos dos endófitos no crescimento micelial do fitopatógeno *P. citricarpa* pode ser observada na Figura 2. Nesta figura percebe-se que os extratos dos endófitos de *Nigrospora*, *Xylariaceae* e *Pseudofusicoccum* tiveram ação inibitória semelhante ao controle positivo (Cp), sendo que o fitopatógeno não ultrapassou a borda do disco de meio de cultura (\varnothing 12 mm) nestas placas. Também observa-se que há diferença no crescimento micelial do fitopatógeno nestes tratamentos quando comparadas ao controle negativo (Cn) e outros tratamentos não eficientes, como D60 = 6,7 cm; E43 = 8,1 cm e E86 = 7,0 cm, todos sem nenhum efeito de inibição (0%).

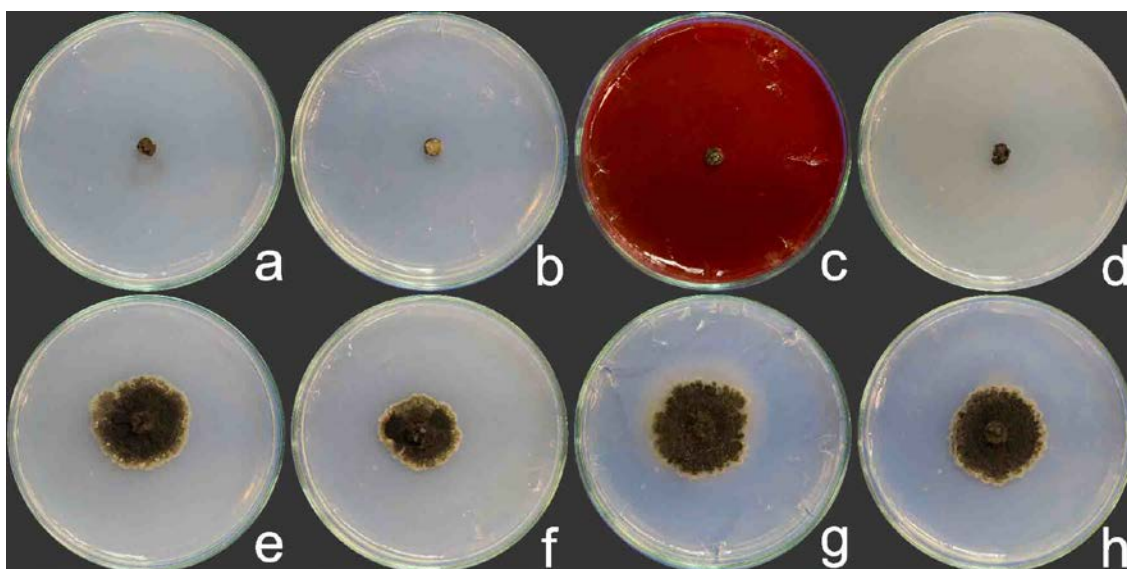


Figura 2 – Placas do experimento dos metabólitos não voláteis – Controle Positivo (a), LGMF1133 (b), LGMF1121 (c), LGMF1119 (d), Controle Negativo (e), D60 (f), E43 (g) e E86 (h).

3.2. Análise dos metabólitos voláteis

Os dados deste experimento, segundo a estatística descritiva, permitem a aplicação de testes paramétricos, Anderson-Darling ($p>0,05$) Batlett e Levene ($p>0,05$). A ANOVA revelou que existem diferenças ($p<0,01$) entre os tratamentos e o controle, porém, diferentemente do teste para metabólitos não voláteis, neste experimento, nenhum isolado apresentou porcentagem de inibição acima de 60% (Tabela 2).

Portanto, nenhum isolado apresentou um taxa de inibição igual ou comparável à taxa de inibição do controle positivo, isto é, não foram capazes de inibir o fitopatógeno de forma eficiente, o que é evidenciado pelo método de agrupamento de Tukey (Tabela 2).

Tabela 2 - Média de crescimento em centímetros com desvio padrão e porcentagem de inibição de *Phyllosticta citricarpa* por isolados, as médias que não compartilham as mesmas letras são significativamente diferentes – Metabólitos voláteis.

Tratamento	N	Média	Desvio Padrão	Porcentagem de Inibição	Agrupamento Tukey
E32	3	13,26	0,2	0%	A
E84	3	12,42	1,6	0%	A B
B84	3	12,33	0,5	0%	A B
1s23	3	12,31	2,1	0%	A B
3a25	2	12,2	1,2	0%	A B C
E70	3	12,06	0,6	0%	A B C
C60	3	11,89	1,2	0%	A B C
E31	3	11,85	1,5	0%	A B C
C1	3	11,8	1,6	0%	A B C
LGMF06 (CN)	9	11,69	0,9	0%	A B C
E39	3	11,67	0,9	0%	A B C D
E86	3	11,58	0,5	1%	A B C D E
D41	3	11,31	0,8	3%	A B C D E
1s39	2	11,3	0,2	3%	A B C D E F
LGMF1133	3	11,27	0,6	4%	A B C D E F
Tratamento	N	Média	Desvio	Porcentagem	Agrupamento Tukey

Padrão de Inibição					
E23	3	11,15	0,8	5%	A B C D E F
D43	2	11,11	0	5%	A B C D E F G
A171	1	10,88	*	7%	A B C D E F G
3a6	3	10,85	0,3	7%	A B C D E F G
C5	3	10,71	1,7	8%	A B C D E F G
E42	3	10,61	0,8	9%	A B C D E F G
E81	3	10,55	1,7	10%	A B C D E F G
A5	3	10,53	0,9	10%	A B C D E F G
1s7	1	10,42	*	11%	A B C D E F G H
E43	3	10,37	1,3	11%	A B C D E F G H
B55	3	10,27	1,4	12%	A B C D E F G H
E6	3	10,24	1,4	12%	A B C D E F G H
B91	3	10,17	0,9	13%	A B C D E F G H
2a11	2	10,11	2,3	14%	A B C D E F G H
E82	3	9,9	1,3	15%	A B C D E F G H
A119	2	9,82	0,4	16%	A B C D E F G H
4a9	2	9,77	0,1	16%	A B C D E F G H
LGMF1119	3	9,7	1,6	17%	A B C D E F G H
B33	1	9,58	*	18%	A B C D E F G H
LGMF1121	2	9,57	2,9	18%	A B C D E F G H
A109	1	9,57	*	18%	A B C D E F G H
E74	3	9,51	1,3	19%	A B C D E F G H
C25	3	9,05	0,8	23%	B C D E F G H
2a25	2	9,05	0,9	23%	A B C D E F G H
A130	1	8,97	*	23%	A B C D E F G H
B81	3	8,87	1	24%	B C D E F G H
E38	3	8,67	1	26%	B C D E F G H
A120	1	8,5	*	27%	A B C D E F G H
A7	1	8,49	*	27%	A B C D E F G H
A128	3	8,32	1	29%	C D E F G H
E33	3	8,26	2,3	29%	C D E F G H
A158	2	8,19	0,9	30%	B C D E F G H
C44	1	8,17	*	30%	A B C D E F G H
C63	2	7,94	0,8	32%	C D E F G H
C43	3	7,86	0,4	33%	D E F G H
A51	2	7,3	0,2	38%	E F G H
A126	2	7,3	2,3	38%	E F G H
2a23	3	7,26	0,7	38%	F G H
D60	3	7,24	0,7	38%	F G H
A144	3	6,87	0,5	41%	G H
B94	2	6,41	1,3	45%	G H
B75	3	5,05	0,3	57%	H
LGMF06 (CP)	10	0,78	0,3	100%	I

Os resultados destes testes permitem afirmar que não há produção de metabólitos voláteis por parte dos fungos endofíticos isolados de *V. divergens* que inibam de forma eficiente o crescimento do fitopatógeno *P. citricarpa*. A média de crescimento dos controles positivos foi de 0,78 cm e o tratamento mais eficiente, B75, teve média de inibição de 57% e crescimento micelial de cinco centímetros. Embora haja uma redução de aproximadamente cinco centímetros contra o controle negativo (LGMF06 CN = 11,7 cm), buscou-se a seleção de endófitos cujos metabólitos voláteis apresentassem taxa de inibição mais alta que a do fungicida glifosinato.

3.3. Aplicação dos extratos e avaliação do crescimento micelial.

Tabela 3 - Média de crescimento em centímetros com desvio padrão e porcentagem de inibição de *P. citricarpa* por extrato – Crescimento micelial com extratos.

Linhagem	Média de crescimento	Porcentagem de inibição
LGMF1119-hfi	0,69 ± 0,10	88%
LGMF1119-hfo	1,02 ± 0,10	83%
LGMF1119-mc	1,04 ± 0,12	83%
LGMF1133-mc	1,07 ± 0,09	82%
LGMF1121-mc	1,08 ± 0,23	82%
LGMF1133-hfo	1,17 ± 0,40	80%
LGMF1133-hfi	1,20 ± 0,20	80%
LGMF1119-eb	1,23 ± 0,16	79%
LGMF1121-hfo	1,24 ± 0,17	79%
LGMF1121-hfi	1,35 ± 0,20	77%
LGMF1121-eb	1,47 ± 0,27	75%
LGMF1133-eb	2,38 ± 0,27	60%
LGMF06 (CN)	5,95 ± 2,2	0%

De doze extratos testados, provenientes dos isolados LGMF1121, LGMF1133 e LGMF1119, o que apresentou melhores resultados contra o fitopatógeno *P. citricarpa* foram os extratos provenientes do isolado de *Xylariaceae* (LGMF1119). Três dos quatro extratos testados registraram porcentagens de inibição superior a 80%, LGMF1119-hfi = 88%, LGMF1119-hfo = 83% e LGMF1119-mc = 83% (Tabela 3), sendo que o extrato que apresentou melhor ação inibitória foi a porção hidrofílica.

Desta maneira, a maior concentração de compostos que possuem ação inibitória estão diluídos na porção aquosa, os resultados tem valor estatístico significativo ($p < 0,01$) rejeitando a hipótese nula de que não há diferenças entre os tratamentos e controles, segundo o teste de Kruskal-Wallis (Apêndice 4).

As diferenças do crescimento micelial entre o tratamento da porção hidrofílica do extrato metabólico do isolado de *Xylariaceae* e o controle positivo (fungicida) e negativo (sem adição) podem ser verificadas na Figura 3. Os tratamentos com os extratos do endófito tiveram média de crescimento de 0,69 cm em oposição às placas com o fitopatógeno sem adição de qualquer substância inibitória (CN) tiveram uma média de crescimento de 5,95 cm.

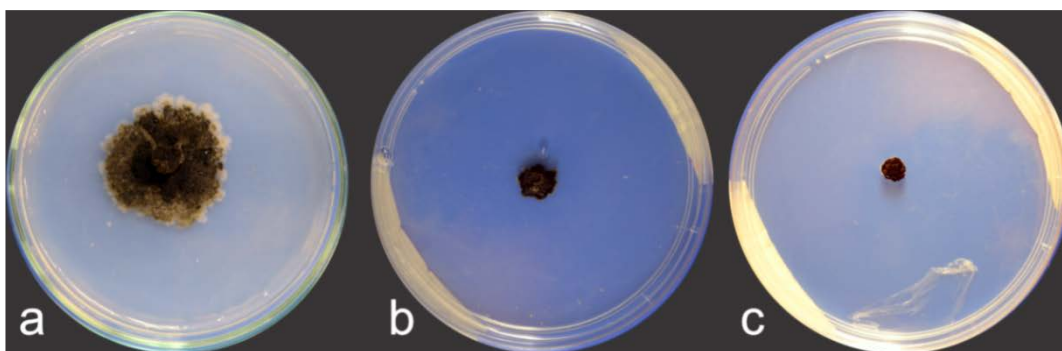


Figura 3 - Crescimento micelial do fitopatógeno LGMF06 em três diferentes condições – Controle negativo (a – sem adição), com adição da porção hidrofílica do extrato LGMF1119-hfi (b), Controle positivo (c).

3.4. Aplicação dos extratos e avaliação da produção de picnídios.

Os testes de formação de picnídios revelou haver diferença entre tratamentos e controle ($p < 0,01$) (Apêndice 5). Sendo que o tratamento que foi mais eficiente na inibição da formação de picnídios foi, como na avaliação do crescimento micelial, a porção hidrofílica do isolado de *Xylariaceae* (LGMF1119).

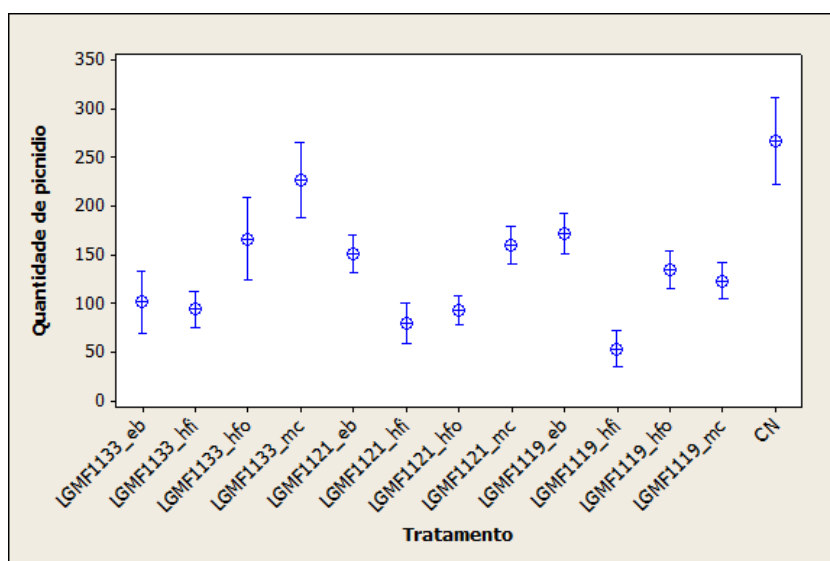


Figura 4 – Boxplot dos tratamentos no experimento de formação de picnídios - eb = extrato bruto; hfi = porção hidrofílica; hfo = porção hidrofóbica; mc = macerado de micélio.

Os tratamentos nos quais foram aplicados extratos hidrofílicos do isolado LGMF1119 houve a produção média de 50 picnídios sobre os fragmentos foliares. Tal média é muito inferior quando comparada ao controle negativo (CN), que apresentou média superior a 250 picnídios, como pode ser observado na Figura 4. Esta diferença é também visível nas testemunhas dos fragmentos de folha apresentados na Figura 5.

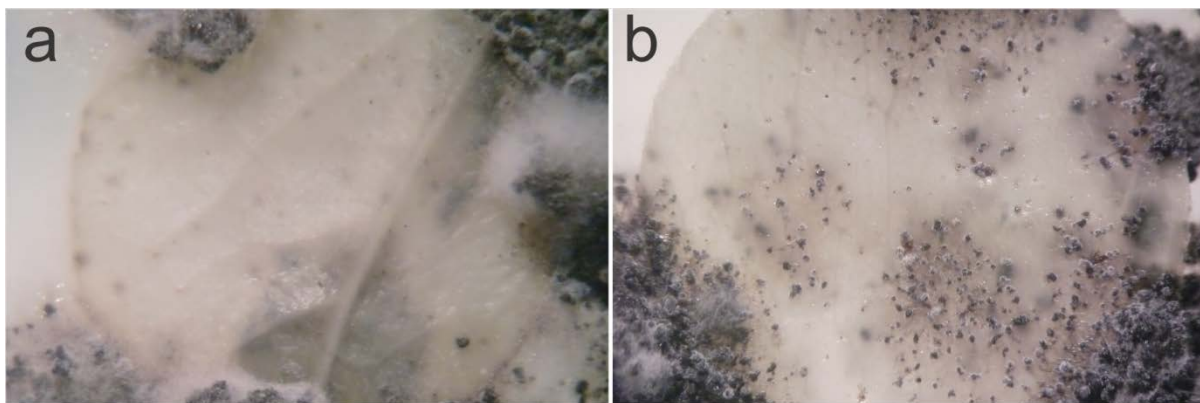


Figura 5 – fragmento de folhas do experimento de formação de picnídios – tratamento LGMF1119-hfi(a) e LGMF06 controle negativo – sem aditivos (b).

4. Discussão

A busca por soluções biotecnológicas não é uma tarefa simples de ser realizada, principalmente devido à dificuldade de acesso a variabilidade, já que restam poucas regiões com sua diversidade conservada e as técnicas laboratoriais que estão disponíveis para o estudo de fungos endofíticos não são eficientes para acessar toda a comunidade (PORRAS-ALFARO; BAYMAN, 2011).

Mesmo com estas dificuldades, um levantamento realizado na amostragem de apenas nove árvores, revelou a existência de pelo menos três fungos endofíticos LGMF1119, LGMF1133 e LGMF1121, com potencial de inibir o crescimento do fitopatógeno *P. citricarpa*.

Os isolados LGMF1133 e LGMF1121 tiveram sucesso na produção de metabólitos não voláteis e segundo a análise filogenética correspondem a isolados do gênero *Nigrospora*. Este gênero possui reconhecida produção de substâncias antifúngicas, sendo que isolados de *Nigrospora sphaerica* produzem o metabólito denominado phomalactona, altamente eficiente contra linhagens *Phytophthora infestans* em baixas concentrações, porém, para outras espécies de fitopatógenos como *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides* e até mesmo outras

espécies do gênero *Phytophthora* requerem concentrações mais elevadas para atingir a concentração mínima inibitória (KIM; CHOI; *et al.*, 2001).

O dado anterior pode explicar em parte o insucesso obtido por estes isolados nos testes com seus extratos, já que uma única concentração foi utilizada, e durante os testes de metabólitos não voláteis, o qual estes isolados tiveram êxito, não era possível medir a concentração de metabólitos depositados por eles no meio. Desta maneira estes isolados continuam sendo promissores para produção de substâncias antifúngica contra fitopatógeno *P. citricarpa*, sendo necessários mais testes com diferentes concentrações assim como avaliar outros métodos de estratificação.

Outras substâncias também podem estar envolvidas no processo de inibição de crescimento do fitopatógeno, pois, outros estudos mostram que o gênero *Nigrospora* é capaz de produzir outras substâncias, como o 1-(5-oxotetrahydrofuran-2-yl)-etil 2-fenilacetato e 3-hidroxibutan-2-il 2-hidroxi-3-fenilpropanoato (ZHANG *et al.*, 2009).

O isolado LGMF1119, que segundo a análise filogenética, pertencente a família *Xylariaceae*, é o isolado que apresenta melhores resultados em todos os testes, e em baixas concentrações (10 mg/mL) é capaz de inibir o crescimento micelial e a produção de picnídios do fitopatógeno *P. citricarpa*. Estes são indícios suficientes para justificar mais estudos para caracterização dos metabólitos produzidos por este isolado.

Fungos endofíticos da família *Xylariaceae* já possuem caracterizações de metabólitos produzidos (BUCHANAN *et al.*, 1995; WANG; LIU, 2004; QIN *et al.*, 2006). Entre os metabólitos produzidos por *Xylariaceae* e que estão caracterizados, está a citocalasina, substância também produzida por outras espécies da família *Xylariaceae* e com comprovada ação antimicrobiana (PONGCHAROEN *et al.*,

2008). A citocalasina atua nos filamentos de actina, levando a extinção da polimerização de actina, seguido de morte celular (BETINA *et al.*, 1972). Outros metabólitos são produzidos por *Daldina*, gênero da família *Xylariaceae*, como a daldinona e daldiniapirona, mas estas substâncias não possuem ação testada e reconhecida contra fitopatógenos (QUANG *et al.*, 2002). Todas as substâncias anteriores podem estar envolvidas no processo de inibição do fitopatógeno *P. citricarpa* sendo necessário o isolamento e caracterização do composto que foi eficaz na inibição.

Os resultados do estudo são promissores, já que demonstram que a diversidade pantaneira pode prover novos compostos, com aplicações biotecnológicas, sendo necessários mais estudos para elucidação dos metabólitos produzidos por estes isolados e aplicação dos mesmos em outras doenças vegetais e ensaios *in vivo*.

5. Referências

- ALHO, C.; FISCHER, E.; OLIVEIRA-PISSINI, L.; SANTOS, C. Bat-species richness in the Pantanal floodplain and its surrounding uplands. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 1, p. 311–320, 2011. SciELO Brasil. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21537604>>. Acesso em: 13/8/2011.
- APHIS. Official Pest Reports - Confirmation of citrus black spot (*Guignardia citricarpa*) in Florida - United States. **EPPO Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 271-280, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2338.2003.00638.x>>. .
- BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G. et al. Nonpathogenic Isolates of the Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa*, Identified as a Cosmopolitan Endophyte of Woody Plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, v. 92, n. 5, p. 464-77, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18943020>>. .
- BALDASSARI, R. B.; WICKERT, E.; GOES, A. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from Citrus spp. **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, n. 2, p. 103-110, 2007. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10658-007-9182-0>>. Acesso em: 10/8/2011.
- BENSON, A. H. Black spot of the orange. **Agricultural Gazette of New South Wales**, v. 6, p. 249-51, 1895.
- BETINA, V.; MICEKOVA, D.; NEMEC, P. Antimicrobial properties of cytochalasins and their alteration of fungal morphology. **Journal of General Microbiology**, v. 71, p. 343-349, 1972. Disponível em: <<http://mic.sgmjournals.org/content/71/2/343.short>>. Acesso em: 14/12/2011.
- BRAJESH KUMAR, S. Exploring microbial diversity for biotechnology: the way forward. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 111-116, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779909002194>>. .
- BUCHANAN, M.; HASHIMOTO, T.; ASAKAWA, Y. Five 10-phenyl-[11]-cytochalasins from a *Daldinia* fungal species. **Phytochemistry**, v. 40, n. 1, p. 135-140, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003194229500201H>>. .
- DALGAARD, P. **Introductory Statistics with {R}**. 2nd ed. Springer, 2002.
- FANTIN-CRUZ, I.; PEDROLLO, O.; COSTA BONECKER, C.; MOTTA-MARQUES, D. DA; LOVERDE-OLIVEIRA, S. Zooplankton Density Prediction in a Flood Lake (Pantanal – Brazil) Using Artificial Neural Networks. **International Review of Hydrobiology**, v. 95, n. 4-5, p. 330-342, 2010. WILEY-VCH Verlag. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/iroh.201011205>>. .

GAO, F.-KANG; DAI, C.-CHAO; LIU, X.-ZHEN. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. **Journal of Microbiology**, v. 4, n. 13, p. 1346-1351, 2010.

GLIENKE, C.; PEREIRA, O. L.; STRINGARI, D. et al. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 26, n. 1, p. 47-56, 2011. Disponível em: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=0031-5850&volume=26&issue=1&page=47>>. Acesso em: 28/9/2011.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2011. MAIK Nauka/Interperiodica distributed exclusively by Springer Science+Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1134/S0003683808020026>>. Acesso em: 19/7/2011.

HAWKSWORTH, D. L.; RAI, M.; BRIDGE, P. D. Mycology: a Neglected Megascience. **Applied Mycology**. p.318, 2009. CABI.

HAWKSWORTH, D. L.; ROSSMAN, A. Y. Where Are All the Undescribed Fungi? **Phytopathology**, v. 87, n. 9, p. 888-891, 1997. Scientific Societies. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.9.888>>. .

HEYDARI, A.; PESSARAKLI, M. A Review on Biological Control of Fungal Plant Pathogens Using Microbial Antagonists. **Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 4, p. 273-290, 2010.

HOKAMA, Y. M.; D.M., A.; M., P. Y.; C., G. Diversidade de Fungos Endofíticos de *Vochysia divergens* Pohl do Pantanal do Mato Grosso do Sul. ,2012.

HONDA, N. K.; CRUZ, A. B.; MESSANA, I. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, p. 97-100, 1995.

KIM, J. C.; CHOI, G. J.; PARK, J. H.; KIM, H. T.; CHO, K. Y. Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from *Nigrospora sphaerica*. **Pest management science**, v. 57, n. 6, p. 554-9, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11407033>>. Acesso em: 4/12/2011.

KOTZÉ, J. M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, v. 65, n. 12, p. 945–950, 1981. Disponível em: http://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1981Article/s/PlantDisease65n12_945.pdf>. Acesso em: 9/8/2011.

MARTINS-CORDER, M. P.; MELO, I. S. Antagonismo IN VITRO de *Trichoderma* spp. A *Verticillium dahliae* KLEB. **Scientia Agrícola**, v. 55, n. 1, p. 1-7, 1998.

NEVES, M.; TROMBIN, V.; MILAN, P.; LOPES, F. O retrato da citricultura brasileira. **MARKESTRAT Centro de Pesquisas e Projetos em Marketing e Estratégias**, p.

137, 2010. Ribeirao Preto. Disponível em:
<<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:O+retrato+da+citri+cultura+brasileira#0>>. Acesso em: 13/8/2011.

NICÁCIO, J.; UCHÔA, M. A. Diversity of Frugivorous Flies (Diptera : Tephritidae and Lonchaeidae) and their Relationship with Host Plants (Angiospermae) in Environments of South Pantanal Region , Brazil. **Florida Entomological Societ**, v. 94, n. 3, p. 443-466, 2011.

NUNES, A. P.; TOMAS, W. M. Análise preliminar das relações biogeográficas da avifauna do Pantanal com biomas adjacentes. **IV Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal**, v. 1, n. 1, 2004.

OWNLEY, B. H.; GRIFFIN, M. R.; KLINGEMAN, W. E. et al. Beauveria bassiana: Endophytic colonization and plant disease control. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 3, p. 267-270, 2008. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201108000700>>. .

PONGCHAROEN, W.; RUKACHAISIRIKUL, V.; PHONGPAICHIT, S. et al. Metabolites from the endophytic fungus Xylaria sp. PSU-D14. **Phytochemistry**, v. 69, n. 9, p. 1900-2, 2008. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18495187>>. Acesso em: 4/12/2011.

PORRAS-ALFARO, A.; BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Annual review of phytopathology**, v. 49, p. 291-315, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19400639>>. Acesso em: 18/8/2011.

POSSIEDE, Y. M.; GABARDO, J.; KAVA-CORDEIRO, V. et al. Fungicide resistance and genetic variability in plant pathogenic strains of Guignardia citricarpa. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 308–313, 2009. SciELO Brasil. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822009000200018&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 13/8/2011.

POTT, A.; OLIVEIRA, A K. M.; DAMASCENO-JUNIOR, G. A; SILVA, J. S. V. Plant diversity of the Pantanal wetland. **Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia**, v. 71, n. 1 Suppl 1, p. 265-73, 2011. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21537599>>. .

POTT, A.; POTT, V. J. Vegetação do Pantanal: fitogeografia e dinâmica. **Anais 2º Simpósio de Geotecnologias no Pantanal**, v. 1, n. 1, p. 1065-1076, 2009. MIT Press. Disponível em: <<http://www.mendeley.com/research/no-title-avail/>>. Acesso em: 13/8/2011.

QIN, X.-D.; DONG, Z.-J.; LIU, J.-K. Two New Compounds from the Ascomycete Daldinia concentrica. **Helvetica Chimica Acta**, v. 89, n. 3, p. 450-455, 2006. WILEY-VCH Verlag. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/hlca.200690045>>. .

QUANG, D. N.; HASHIMOTO, T.; TANAKA, M. et al. Chemical Constituents of the Ascomycete Daldinia concentrica. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 12, p.

1869-1874, 2002. American Chemical Society. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1021/np020301h>>. .

SANTOS, L. G. R. O. ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO DE UNGULADOS FLORESTAIS EM UMA ÁREA DO PANTANAL. **Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**, 2009.

SCHUBERT, T.; SUTTON, B. Citrus Black Spot (*Guignardia citricarpa*) discovered in Florida. **pbcgov.org**, , n. Kotzé 1981, p. 2008-2010, 2010. Disponível em:
<<http://pbcgov.org/coextension/agriculture/citrusblackspotpestaalert.pdf>>. Acesso em: 13/8/2011.

SILVA, H. DA; PETRY, A.; SILVA, C. DA. Fish communities of the Pantanal wetland in Brazil: evaluating the effects of the upper Paraguay river flood pulse on <i>baía</i> Caiçara fish fauna. **Aquatic Ecology**, v. 44, n. 1, p. 275-288, 2010. Springer Netherlands. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10452-009-9289-9>>. .

SUTTON, B. *Guignardia citricarpa*. **CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and bacteria**, v. 33, n. 2, p. 271-280, 1966. Disponível em:
<<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2338.2003.00638.x>>. Acesso em: 5/12/2011.

TERESA, F. B.; MEI ROMERO, R. DE; LANGEANI, F. Pisces, Aquidauana and Miranda drainages, upper Paraguay River basin, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Check List**, v. 6, n. 4, p. 596-601, 2010. Disponível em:
<<http://www.checklist.org.br/getpdf?SL035-10>>. Acesso em: 15/2/2012.

WANG, F.; LIU, J.-K. A Pair of Novel Heptentriol Stereoisomers from the Ascomycete *Daldinia concentrica*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 87, n. 8, p. 2131-2134, 2004. WILEY-VCH Verlag. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1002/hlca.200490193>>. .

ZHANG, Q.-H.; TIAN, L.; ZHOU, L.-D. et al. Two new compounds from the marine *Nigrospora sphaerica*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 11, p. 962-966, 2009. Taylor & Francis. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1080/10286020903339614>>. .

ZHAO, J.; ZHOU, L.; WANG, J. et al. Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. **Applied Microbiology**, p. 567-576, 2010.

7. DISCUSSÃO GERAL

Na última década os fungos endofíticos foram alvos de intensas pesquisas para o levantamento de sua riqueza e em busca de novos compostos, frutos do metabolismo secundário destes microrganismos, e para serem aplicados em diversas áreas da biotecnologia. Grande parte destes estudos foi realizada a partir de isolados retirados de regiões de alta latitude, e comparativamente, estas regiões possui uma diversidade menor em relação aos trópicos. Recentemente começou a ser explorada a riqueza de endófitos nas regiões tropicais, e se forem levadas em consideração as grandes descobertas já realizadas nos locais com baixa diversidade, sem sombra de dúvida que muito será descoberto daqui em diante, visto que, até o momento não foi encontrado nenhuma espécie vegetal no ambiente que não possua endófitos.

Por esta razão os fungos endofíticos podem contribuir enormemente para a riqueza global do Reino Fungi e tornar este grupo, uma das formas de vida mais diversa do planeta.

É preciso salientar, que não somente a busca por novas espécies para acessar novas moléculas é importante, mas, lembrando que a maioria dos países tropicais, e isso incluem o Brasil, possui frágeis legislações de proteção ambiental. Por isso, é imprescindível o mapeamento e catalogação de microrganismos em regiões importantes como o Pantanal, para a sua prospecção sustentável e conservação.

Pelos motivos apresentados acima, este estudo torna-se importante, pois, promove a primeira descrição ampla dos microrganismos endofíticos do ecossistema pantaneiro. Foram descritos 15 gêneros habitando endofiticamente uma única espécie vegetal e dois destes gêneros ainda não haviam sido descritos

como endófitos de folhas. Certamente este ambiente ainda revelará importantes descobertas para a micologia.

São necessários mais estudos a respeito da população de endófitos, e mais vegetais precisam ser avaliados, porque, *V. divergens* não é a única espécie mono dominante da região. Também é necessário descobrir a influência dos fatores abióticos sobre a população de endófitos, como por exemplo, o ciclo hidrológico, é de enorme relevância para o desenvolvimento de estratégias preservacionistas.

Não surpreendentemente, já no primeiro isolamento de endófitos do Pantanal, foi possível isolar organismos com aplicação biotecnológica.

As culturas agrícolas com passar do tempo aumentam suas áreas de produção, somando a isso existe a introdução de espécies exóticas em diversos ambientes e a resultante da soma destes fatores é a disseminação de fitopatógenos. Um destes patógenos é a mancha preta do citros, o responsável por grandes perdas comerciais para a citricultura internacional.

Novas abordagens são desenvolvidas para a solução deste importante problema agrônômico, e uma destas experimentações, é a aplicação dos metabólitos de fungos endofíticos, que no presente estudo inibiu *in vitro*, com sucesso, o fitopatógeno *P. citricarpa* causador da MPC. Além da clara vantagem de inibir o desenvolvimento desta doença, este composto é de origem natural, existindo a possibilidade de este ser menos agressivo que os compostos sintéticos, tanto para o fruto como para o consumidor, tornando-se esta uma característica que agrega maior valor econômico ao produto.

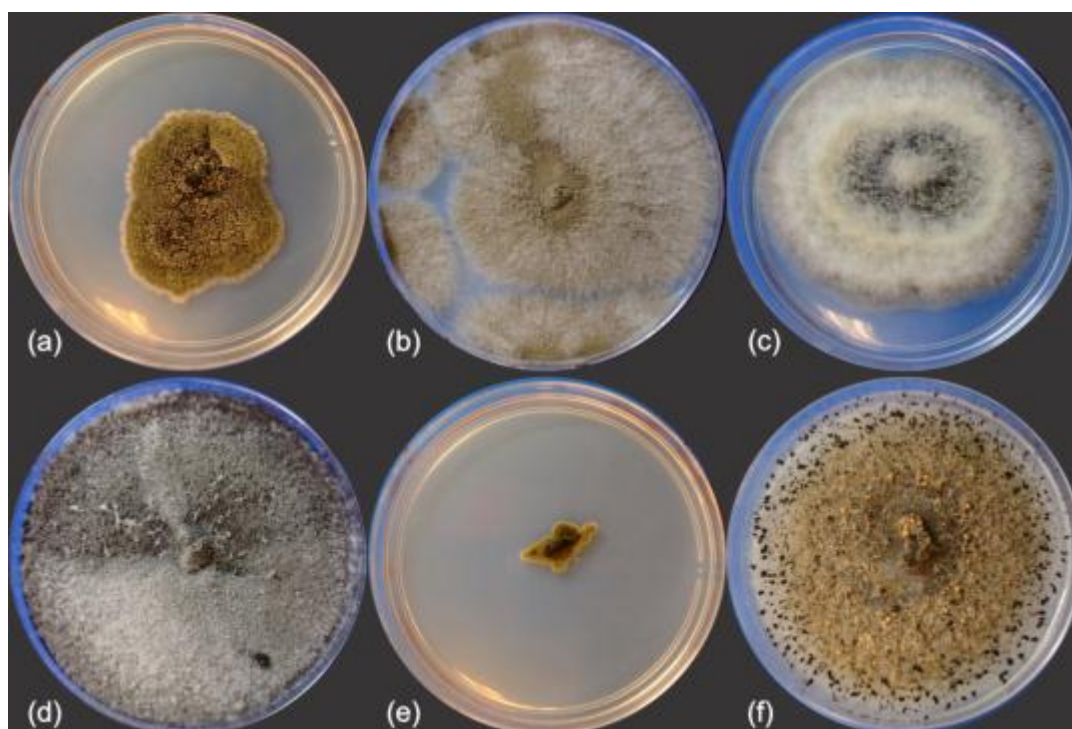
8. CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados foi possível concluir que:

- As folhas de *Vochysia divergens* são colonizadas endofiticamente por diversas espécies de fungos.
- Os fungos endofíticos isolados de folhas de *V. divergens* apresenta potencial biotecnológico.
- O isolado endofítico pertencente a família *Xylariaceae* (LGMF1119) inibe o crescimento do fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*.
- São necessários novos e maiores levantamentos da comunidade endofítica no Pantanal, e caracterizar os metabólitos que inibem *P. citricarpa* em ensaios *in vivo*.

9. APÊNDICES

APÊNDICE 1 – PLACAS DE CULTURA DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Vochysia divergens*.



Placas de cultura dos endofíticos de *Vochysia divergens* aos 28 dias de crescimento em estufa a 28° C – (a) *Phyllosticta capitalensis*; LGMF1139 – (b) *Xylariaceae* spp.; LGMF1134 – (c) *Xylariaceae* spp.; LGMF1131 – (d) *Nigrospora* sp.; LGMF1121 – (e) *Mycosphaerella* sp. LGMF1117 – (f) *Colletotrichum* sp.; LGMF1173.

APÊNDICE 2 – KRUSKAL-WALLIS – METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS, COM 73 GRAUS DE LIBERDADE E VALOR DE $P < 0,01$.

	N	Ranque Médio
Valor Global	204	102,5
H = 166,70 DF = 73 P = 0,000		

APÊNDICE 3 – TESTE DE DUNN PARA COMPARAÇÃO DE MEDIANAS EM ISOLADOS COM EFICIÊNCIA ACIMA DE 90% - METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS.

Teste	Valor de Q	Q crítico	Comentário
CP vs LGMF1133	0,5685	2,5760	Não rejeita Ho
CP vs LGMF1121	0,3722	2,5760	Não rejeita Ho
CP vs LGMF1119	0,9340	2,5760	Não rejeita Ho
CP vs LGMF1118	0,9746	2,5760	Não rejeita Ho
CP vs CN	2,8135	2,5760	Rejeita Ho

APÊNDICE 4 – KRUSKAL-WALLIS – CRESCIMENTO MICELIAL COM ADIÇÃO DE EXTRATOS, COM 13 GRAUS DE LIBERDADE E VALOR DE $P < 0,01$.

Tratamento	N	Mediana	Ranque	Z
LGMF1133-eb	10	2,4312	125,1	4,42
LGMF1133-hfi	10	1,1583	74	0,29
LGMF1133-hfo	10	1,061	57,2	-1,08
LGMF1133-mc	10	1,0877	55,8	-1,19
LGMF1121-eb	10	1,3901	105,3	2,81
LGMF1121-hfi	10	1,3145	96,7	2,12
LGMF1121-hfo	10	1,2361	82,6	0,98
LGMF1121-mc	10	1,0503	56,1	-1,17
LGMF1119-eb	10	1,2018	79,6	0,74
LGMF1119-hfi	10	0,6826	17	-4,33
LGMF1119-hfo	10	1,0381	45,8	-2
LGMF1119-mc	10	1,0575	50,9	-1,59
LGMF06 (CN)	10	5,8024	135,5	5,26
LGMF06 (CP)	10	0,3319	5,5	-5,26
Global	140		70,5	
H = 109,56 DF = 13 P = 0,000				
H = 109,56 DF = 13 P = 0,000 (ajustado para empates)				

APÊNDICE 5 – KRUSKAL-WALLIS – FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS COM ADIÇÃO DE EXTRATOS, COM 12 GRAUS DE LIBERDADE E VALOR DE $P < 0,01$.

Tratamento	N	Mediana	Ranque	Z
LGMF1133_eb	20	85	92,8	-2,22
LGMF1133_hfi	20	91,5	82,5	-2,87
LGMF1133_hfo	20	148	151,4	1,48
LGMF1133_mc	20	228,5	203,2	4,75
LGMF1121_eb	20	146,5	153,8	1,63
LGMF1121_hfi	20	76	64,6	-4,01
LGMF1121_hfo	20	98,5	79,8	-3,05
LGMF1121_mc	20	159	163,8	2,26
LGMF1119_eb	19	169	177,1	3,02
LGMF1119_hfi	20	56,5	39,4	-5,59
LGMF1119_hfo	20	134	132,4	0,28
LGMF1119_mc	20	134,5	121,3	-0,42
LGMF06 (CN)	16	273,5	223,2	5,33
Global	255		128	

H = 129,65 DF = 12 P = 0,000
H = 129,66 DF = 12 P = 0,000 (ajustado para empates)

APÊNDICE 6 – CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DOS ISOLADOS 2008

Morfo- espécie	Profundidade do micélio no ágar	Presença de micélio aéreo	Cor do micélio aéreo	Cor do micélio no substrato	Textura da superfície da colônia
1S3	Superficial	Pouco	Branco	Preto e branco	Fibroso
1S4	Superficial	Muito	Branco	Preto e branco	Lanoso
1S5	Raso	Pouco	Branco	Amarelo	Fibroso
1S7	Superficial	Escasso	Preto	Preto	Granular
1S10	Profundo	Muito	Branco c/	Branco	Fibroso
1S11	Superficial	Escasso	Preto	Preto	Granular
1S17	Raso	Escasso	Preto e branco	Preto	Granular
1S23	Profundo	Muito	Preto e branco	Preto	Fibroso
1S24	Superficial	Escasso	Branco	Preto	Lanoso
1S34	Raso	Pouco	Cinza	Preto	Lanoso
1S39	Superficial	Escasso	Branco c/	Branco	Arenoso
2A2	Raso	Pouco	Preto	Preto	Aveludado
2A3	Raso	Nenhum	Marrom e	Marrom	Arenoso
2A5	Raso	Escasso	Cinza	Preto e branco	Arenoso
2A7	Profundo	Muito	Branco	Preto	Fibroso
2A11	Profundo	Escasso	Preto c/ fibras	Preto	Fibroso
2A17.A	Superficial	Escasso	Marrom	Preto e branco	Arenoso
2A20.1	Superficial	Escasso	Amarelo	Amarelo	Arenoso
2A23	Superficial	Escasso	Marrom	Preto e branco	Arenoso
2A25	Profundo	Muito	Preto	Preto	Lanoso
2A76	Profundo	Muito	Preto e branco	Vermelho	Lanoso
3A1	Superficial	Escasso	Branco	Branco	Granular
3A6	Superficial	Escasso	Cinza	Preto	Aveludado
3A10	Superficial	Escasso	Branco	Laranja	Fibroso
3A11	Profundo	Muito	Preto e branco	Preto	Fibroso
3A21	Superficial	Escasso	Marrom	Preto e branco	Arenoso
3A22	Superficial	Escasso	Marrom	Preto e branco	Arenoso
3A24	Profundo	Muito	Preto	Preto	Fibroso
3A25	Superficial	Pouco	Laranja	Laranja	Granular
3A28	Raso	Nenhum		Preto	Granular
4A2	Profundo	Muito	Cinza escuro	Preto	Fibroso
4A3	Superficial	Escasso	Marrom e	Marrom escuro	Arenoso
4A9	Superficial	Escasso	Marrom e	Marrom escuro	Arenoso

10. ANEXOS

ANEXO 1 - METODOLOGIA DETALHADA DOS PROCEDIMENTOS EXECUTADOS

A) PREPARO DO MATERIAL

Os materiais utilizados para a realização das atividades laboratoriais foram previamente esterilizados. Meios de cultura, soluções, espátulas e palitos de transferência foram esterilizados em autoclave, à pressão de 1 atmosfera, por 20 minutos. Vidrarias foram esterilizadas em forno Pasteur a 180° C por 4 horas.

B) MEIOS DE CULTURA

MEIO ÁGAR DE BATATA E DEXTROSE (BDA)

Batata	200 g
Dextrose	20 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000 mL
Ágar	15 g
pH 5,8	

As batatas foram descascadas, cortadas em pequenos pedaços e cozidas em 500 mL de água destilada por 20 minutos em forno micro-ondas. As batatas foram então descartadas e ao caldo restante acrescentado a dextrose. O volume foi completado para 1000 mL, o pH ajustado para 5,8 com NaOH 1N e o ágar acrescentado diretamente aos frascos. O meio foi auto clavado a 121°C, 1 atm, por 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.

C) SOLUÇÕES E REAGENTES

LACTOFENOL – AZUL ALGODÃO

LACTOFENOL

Fenol	20 g
Ácido láctico	40 mL
Glicerina	40 mL
H ₂ O destilada.	20 mL

AZUL ALGODÃO

Azul algodão	0,5 g
H ₂ O destilada	50 mL

Devem ser misturados os quatro primeiros itens do lactofenol a 5 mL da solução de azul algodão e por último acrescentar 20 mL de ácido acético glacial.

DNA POLIMERASE

Utilizou-se a enzima Taq DNA polimerase Platinum, da marca Invitrogen, nas reações de amplificação, na concentração de 5U/μL.

dNTPs

Os quatro desoxirribonucleotídeos (dAPT, dTTP, dGTP, dCTP) estoques (100mM), foram diluídos em água ultra pura a 2,5mM (solução de uso). Nas reações de amplificação, a concentração final utilizada foi de 0,2mM de cada dNTP.

GEL DE AGAROSE (0.8%)

Agarose 0,8 g
Tampão TBE 1x 100 mL

GEL DE AGAROSE (1,5%)

Agarose 1,5 g
Tampão TBE 1x 100 mL

MARCADOR DE PESO MOLECULAR (DNA Ladder 100pb INVITROGEN)

O marcador de peso molecular foi diluído na proporção de: 1 μ L de marcador : 1 μ L do tampão da amostra : 4 μ L de água Milli-Q autoclavada, resultando em uma solução com concentração de 50ng/ μ L.

MARCADOR DE PESO MOLECULAR (DNA DE FAGO LAMBDA CLIVADO COM Hind III Gibco®)

O marcador de peso molecular foi diluído no momento do uso na proporção de: 1 μ L L de marcador : 1 μ L do tampão da amostra : 4 μ L de água Milli-Q autoclavada, resultando em uma solução com concentração de 50ng/ μ L.

TAMPÃO DE CORRIDA TBE 10X PH 8,0

Trizma base	54g
Ácido Bórico (H ₃ BO ₃)	27,5g
EDTA	4,65g
H ₂ O Milli-Q	p/ 500mL

A solução foi autoclavada a 1 atm e estocada em temperatura ambiente.

D) CONSERVAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Os isolados fungicos estão sendo estocados em tubos com BDA e. Para o preparo dos tubos, o meio de cultura é derretido e aproximadamente 5mL são distribuídos em pequenos frascos de vidro que são tampados com rolha de algodão. Após esterilização destes, em autoclave por 20 minutos a 1 atm; são inclinados a temperatura ambiente em um suporte, de maneira que o meio solidifique inclinado em forma de bico de flauta (ângulo de 45°). Os fungos são então repicados nos frascos com meio, citados anteriormente, e incubados a 28°C, entre 3 e 7 dias. Os frascos são então vedados com rolhas plásticas e armazenados em refrigerador (4°C). A cada dois meses, ou quando necessário, as linhagens são repicadas, seguindo a mesma metodologia citada acima.

E) EXTRAÇÃO DE DNA

EXTRAÇÃO DE DNA DE LINHAGENS FÚNGICAS

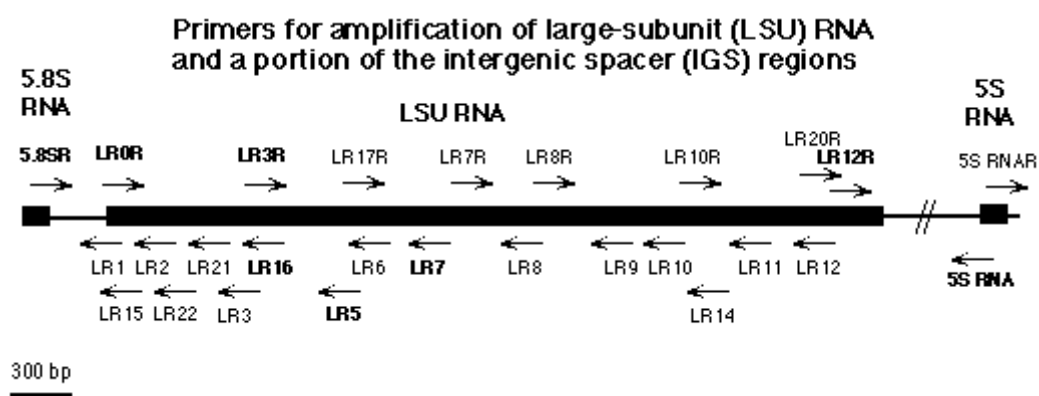
Os isolados obtidos a partir de isolamento foram semeados em placas com Agar BDA recobertas com papel celofane estéril, para permitir a retirada do micélio sem ágar. A extração de DNA foi realizada utilizando-se o Ultraclean Microbial DNA Isolation Kit, MoBio®.

De acordo com o protocolo do fabricante, em torno de dois centímetros quadrados do micélio são coletados com o auxílio de uma espátula estéril e depositados em Microbead Tubes (MO BIO®) contendo 300 µL de solução Microbead (MO BIO®) e 50 µL de solução MD1 (MO BIO®). Os tubos são levados ao Banho-Maria 60°C por 5 minutos e em seguida são colocados vortex horizontal e homogeneizados em velocidade máxima por 3 minutos, repete-se este procedimento três vezes. Após este procedimento, são centrifugados por 5 segundos a 9.700 rpm. Transfere-se o sobrenadante para 2 mL Collection Tubes (MO BIO®). Adiciona-se 100 µL de solução MD2 (MO BIO®), e homogeneiza-os por 5 segundos em vortex. Os tubos são incubados por 5 minutos a 4°C (em gelo) e então centrifugados a 9.700 rpm por 1 minuto em temperatura ambiente. Forma-se um pellet, e então retira-se todo o sobrenadante, que deve ser colocado em novos 2ml Collection Tubes (MO BIO®). Adiciona-se então 900 µL de solução MD3 (MO BIO®). Os tubos devem ser homogeneizados em vortex por 5 segundos. Coleta-se aproximadamente 600 µL da amostra e esta é transferida para Spin Filters Tubes (MO BIO®). Estes são centrifugados por 30 segundos a 9.700 rpm. Descarte-se toda a solução filtrada que se encontra no fundo do tubo, e repete-se esta etapa com o restante do volume que estava no outro tubo com solução MD3 (MO BIO®). Lava-se o filtro com 300 µL de solução MD4 (MO BIO®) e procede-se a outra centrifugação a 9.700 rpm por 30 segundos. Descarta-se o filtrado e centrifuga-se novamente por 30 segundos a 9.700 rpm, para remover qualquer resíduo da solução MD4 (MO BIO®). Retira-se os filtros, estes devem ser colocados 2 mL Collection Tubes (MO BIO®) limpos. Adiciona-se então, 50 µL de solução MD5 (MO BIO®) no centro do filtro. Aguardar 5 minutos e centrifuga-se por 30 segundos a 9.700 rpm. Este filtro deve ser descartado e o DNA estará no tubo, pronto para uso.

A quantificação e integridade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v), com marcador de peso molecular Hind III Gibco®, corado com GelRed® e visualizada em luz ultravioleta e utilizando-se também o espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific).

F) SEQUENCIAMENTO

LSU



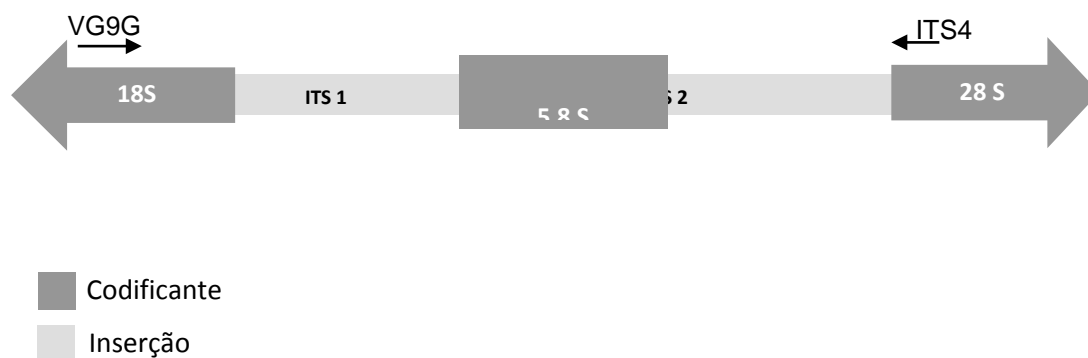
REGIÃO AMPLIFICADA	PRIMER	SEQUÊNCIA
Sequenciamento parcial LSU	LR0R	5' ACCCGCTGAACTTAAGC3'
	LR5	5' TCCTGAGGGAAACTTCG3'

REGIÃO ITS rDNA

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se os primers V9G e ITS4. Estes permitem a amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2; localizada entre os genes 18SrDNA e 28SrDNA do DNA ribossomal de fungos. O ITS é dividido em ITS1 que localiza-se entre os genes 18S e o 5.8S; já o ITS2 separa os genes 5.8S e 28S. Estas regiões, após a transcrição darão origem ao RNA ribossômico.

FONTE: De Hoog e Gerrits Van Den Ende (1998)¹. White e Morrow (1990)².

REGIÃO AMPLIFICADA	PRIMER	SEQUÊNCIA
ITS1-5, 8S-ITS2 DO rDNA	V9G ¹	5' TTACGTCCTGCCCTTTGTA 3'
	ITS4 ²	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'



REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2 DO DNA RIBOSSOMAL

NOTA: Gene que codifica o RNA ribossômico com 475 pb, sendo 158 pb codificantes.

FONTE: Muehlmann-Fischer (2010) adaptado de Stringari (2009).

G) PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA PCR

Após realização da PCR tanto para a região ITS, quanto para gene 16S o produto desta reação é purificado adicionando-se 1uL de acetato de amônio 7,5M e 25uL de Etanol absoluto em cada poço da placa de reação. A mesma é vedada e misturada por imersão e então centrifugada por 45' a 3220 RCF por 15°C. O sobrenadante deverá ser descartado. A placa invertida deverá receber um spin a 300 RCF e em cada poço será adicionado 100uL de etanol 70% recém preparado, não gelado. Após, será dado um novo spin a 2500 RCF por 1' com a placa aberta. O sobrenadante é novamente descartado para um novo spin a 300 RCF. Adiciona-se então 12uL de água ultra pura e o material deverá ficar ressuspensando por 12 horas para posterior quantificação do produto (GOMES, 2008).

A quantidade e a pureza de ácidos nucleicos será determinada por densidade óptica utilizando-se espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific) e também utilizando-se gel de agarose 1,5% (p/v).

H) REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 e 16S do rDNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia segundo Sanger et al. (1977). Neste, há a incorporação de dideoxinucleotídeos fluorescentes, em Sequenciador Automático MegaBACE™ 1000 DNA Analysis Systems (Amersham Biosciences®).

O produto da PCR deverá ser diluído para concentração final de 10ng. Para a reação de sequenciamento utiliza-se cerca de 50 ng de DNA purificado para região ITS1-5,8S-ITS2 e 80ng de DNA para gene 16S, 2 µL (1 µM, ou 10 pmols) do primer ITS1 e 2 µL de mistura para sequenciamento ET (kit: "DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE"; Amersham Biosciences®), completando com 2 µL de água ultrapura para um volume final de 10 µL. As mesmas condições são aplicadas para todos os primers.

I) PURIFICAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Para purificação do produto do sequenciamento, utiliza-se o gel de filtração Sephadex™ G-50 medium (GE Healthcare). Para tal, deverá ser colocadas pequenas quantidades de Sephadex™ sobre um dos cantos da placa molde MultiScreen Column Loader (Millipore), também chamada de “enchedor de colunas” e com auxílio de uma espátula de acrílico, deve ser espalhado até completar totalmente os poços. Encaixa-se a placa da reação sob a placa molde de modo que cada poço da placa corresponda a um poço do enchedor de colunas, para que virando-se as placas o sephadex seja assim transferido para a placa da reação.

Será acrescentado 300µL de água ultrapura autoclavada em cada poço. A placa ficará em repouso por 2 a 3 horas, embaixo desta, deve-se deixar outra placa (que servirá como placa coletora) de 96 poços para evitar contato com superfícies sujas e também para retenção da água no momento da centrifugação. As duas placas devem ser fixadas com fita adesiva. Após, a placa será centrifugada a 910 RCF por 5', descarta-se a água da placa de apoio, acrescenta-se 100 µL de água ultrapura autoclavada em cada poço e centrifuga-se novamente a 910 RCF por 5'. Substituir a placa coletora por uma nova placa. Adicionar os 10 µL da reação de sequenciamento na placa de purificação sem encostar as pontes no sephadex. Centrifugar por 5' a 910 RCF. Fechar a placa com Filme Adesivo Plástico para vedação de microplacas (Axygen) e envolve-la com papel alumínio. Proceder à eletroforese em seqüenciador automático de DNA modelo MegaBACE™ 1000 DNA Analysis Systems (Amersham Biosciences®).

Os parâmetros de eletroforese selecionados durante o sequenciamento serão: voltagem de injeção de 2kV, tempo de injeção de 100 segundos, voltagem da corrida de 6kV e tempo de corrida de 240 minutos.

Através da utilização dos programas disponíveis no pacote de softwares do seqüenciador MegaBACE serão realizadas as análises das corridas realizadas. Eletroferogramas (gráficos formados a partir do sinal obtido com a emissão de fluorescência) são gerados pelo Sequence Analyser. Através do programa ScoreCard é possível verificar a eficiência e informações das seqüências, como por exemplo, o número de nucleotídeos obtidos.